

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. G. Aumüller

Abteilung für Immunbiologie

Leiterin: Prof. Dr. B. Steiniger

**Die weiße Pulpa der menschlichen Milz:
Eine dreidimensionale Rekonstruktion**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lars Rüttinger

aus Offenburg

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 22. August 2002.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. B. Steiniger

Korreferent: PD Dr. Beyer

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	Humanmilz.....	6
2.2	Primärantikörper	6
2.3	Antikörpernachweissystem.....	6
2.4	Sonstige Reagenzien.....	6
2.4.1	PBS (Phosphate buffered saline)	6
2.4.2	TBS (Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline).....	7
2.4.3	Verdünnungslösung für die Primärantikörper	7
2.4.4	Verdünnungslösung für die Sekundärantikörper.....	7
2.4.5	Farbreaktionslösung	7
2.5	Protokoll der immunhistologischen Färbungen	8
2.5.1	Paraffinschnitte	8
2.5.2	Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex Methode.....	8
2.5.3	Durchführung der Färbungen.....	8
2.5.4	Negativkontrollen	9
2.6	Dreidimensionale Rekonstruktion der weißen Milzpulpa	10
2.6.1	Vorbereitung des Paraffinblocks.....	10
2.6.2	Bildbearbeitung	10
3	ERGEBNISSE.....	13
3.1	Die dreidimensionale Rekonstruktion der Lymphfollikel und des Gefäßsystems	15
3.2	Die dreidimensionale Rekonstruktion der T-Zellregion und des Gefäßsystems	26
3.3	Zusammenfassende Darstellung der B- und T-Zellregionen.....	34

4	DISKUSSION	37
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	49
6	LITERATURVERZEICHNIS	51
7	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	56
8	DANKSAGUNG	57
9	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	58

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-biotinylated peroxidase complex
Aq. bidest.	Aqua bidestillata
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Ig	Immunglobulin
NRS	Normalrattenserum
PALS	Periarterioläre lymphatische Scheide
PBS	Phosphate buffered saline
TBS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline

1 EINLEITUNG

Schon Galen (131-201) nannte die menschliche Milz ein „rätselhaftes Organ“ (van Krieken und te Velde 1988). Diese Einschätzung lässt sich auch aus heutiger Sicht erstaunlicherweise noch aufrechterhalten. Obwohl die Funktion der Milz teilweise aufgeklärt wurde, ist die Histologie dieses Organs beim Menschen in zahlreichen Details noch immer unverstanden. Unser Wissen über die Mikroarchitektur der Milz stammt zu einem großen Teil aus Untersuchungen an Tieren (van Krieken et al. 1983; van Krieken et al. 1985a). Eine Quelle für Missverständnisse ist die Tatsache, dass zahlreiche aus der Tierforschung stammende Definitionen auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen wurden, obwohl die Humanmilz eine von tierischen Milzen abweichende Struktur besitzt (van Krieken und te Velde 1988). Darüber hinaus wurden Befunde aus Studien an verschiedenen Tierarten unkritisch mit Erkenntnissen aus der Forschung an menschlichen Milzen vermengt. Dies hat zu einer bemerkenswerten Vielfalt von unterschiedlichen Modellen der mikroskopischen Struktur der Humanmilz sowohl in der Primärliteratur als auch in Lehrbüchern der Histologie geführt (Steiniger und Barth 2000).

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, den komplizierten Feinbau der menschlichen Milz besser zu verstehen. Dazu wurden aus Serienschnitten dreidimensionale Rekonstruktionen von Lymphfollikeln und den dazugehörigen T-Zellregionen jeweils zusammen mit ihren Arteriolen erstellt. Dadurch konnten Erkenntnisse gewonnen werden, die sich aus der alleinigen Analyse von Einzelschnitten nicht erzielen lassen. Im Folgenden wird zunächst ein Überblick über den gegenwärtigen Kenntnisstand der Milzhistologie gegeben. Da Struktur und Funktion der Milz bis jetzt am intensivsten an Ratten und Mäusen erforscht wurden, wird mit diesen Spezies begonnen. Daran schließt sich eine Darstellung der Verhältnisse beim Menschen an.

Das Parenchym der Rattenmilz gliedert sich in die weiße und rote Pulpa. Die weiße Pulpa setzt sich aus B- und T-Zellarealen zusammen. Sie besteht aus drei Kompartimenten, nämlich der periarteriolen lymphatischen Scheide (PALS), den Follikeln und der Marginalzone (Veerman und van Ewijk 1975). Während die PALS hauptsächlich aus rezirkulierenden T-Lymphozyten besteht, stellen die

Follikel Ansammlungen wandernder B-Zellen dar (van Ewijk und Nieuwenhuis 1985). Primärfollikel sind durch das Fehlen eines Keimzentrums gekennzeichnet. Ein Keimzentrum entsteht erst nach Kontakt mit einem Antigen im Rahmen einer Immunreaktion und charakterisiert den sog. Sekundärfollikel. Im Keimzentrum finden sich hauptsächlich B-Zellen, aber auch T-Zellen sowie follikuläre dendritische Zellen und Makrophagen (Kroese et al. 1990). Die Korona (auch Mantelzone genannt) umgibt das Follikelzentrum und bildet das Äquivalent des Primärfollikels, der durch die Entwicklung eines Keimzentrums an den Rand gedrängt wurde (Steiniger und Barth 2000). Die B-Zellen der Korona sind durch die gleichzeitige Expression von Oberflächen IgM und IgD gekennzeichnet (Gray et al. 1982).

Die Marginalzone umgibt bei Ratten sowohl die PALS als auch die Follikel (Veerman und van Ewijk 1975). Sie besteht hauptsächlich aus IgM⁺ und IgD⁻ B-Gedächtniszellen (Liu et al. 1988). Die Zellen der Marginalzone spielen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der schnellen Antikörperbildung gegen Polysaccharide von Bakterienoberflächen (Mac Lennan und Liu 1991).

Die Rattenmilz wird von der Arteria splenica mit Blut versorgt. Sie teilt sich in mehrere Segmentarterien auf, aus denen Zentralarteriolen hervorgehen. Diese sind von einer konzentrisch angeordneten PALS umgeben. Die Zentralarteriolen geben Äste ab, welche die Follikel durchqueren (Satodate et al. 1986) und als Kapillaren in den sog. Marginalsinus einmünden (Veerman und van Ewijk 1975; Sasou et al. 1976). Hierbei handelt es sich um ein spezielles Gefäß. Es befindet sich zwischen Follikel bzw. der PALS und der Marginalzone (Steiniger und Barth 2000). Der Marginalsinus scheint eine asymmetrische Permeabilität zu besitzen. Farbstoffe, die über die Aorta abdominalis injiziert wurden, fanden sich in der Marginalzone, nicht aber in Follikeln wieder (Sasou et al. 1976). Auch B- und T-Lymphozyten gelangen bei ihrer Einwanderung in die weiße Milzpulpa zunächst aus dem Marginalsinus in die Marginalzone. Aus der Marginalzone wandern rezirkulierende T-Zellen dann in die PALS, während B-Zellen entlang der äußeren PALS in die Follikel einwandern (van Ewijk und Nieuwenhuis 1985).

Die rote Pulpa der Rattenmilz setzt sich bei Ratten und Menschen aus Sinus und Marksträngen zusammen. Die Sinus bestehen bei beiden Spezies aus Endothelzellen, die von Basalmembranstreifen ringförmig umfasst werden (Chen und

Weiss 1972 und 1973). Die Markstränge umgeben die Sinus und bilden ein Netzwerk aus Fibroblasten und retikulären Fasern, in dem sich Erythrozyten, Lymphozyten, Granulozyten, Thrombozyten, Makrophagen und Plasmazellen befinden (Steiniger und Barth 2000). Dieses System wird von Ästen der Zentralarteriolen mit Blut versorgt (Satodate et al. 1986). Es wird als „offener“ Teil der Milzzirkulation bezeichnet. Das Blut kehrt durch Schlitze zwischen den Endothelzellen aus dem Netz der Pulpastränge in die Sinus zurück (Chen und Weiss, 1973; Mac Donald et al. 1987; Groom et al. 1991). Satodate et al. (1986) und auch Sasou et al. (1986) finden in den von ihnen elektronenmikroskopisch untersuchten Rattenmilzen keinen Beweis für eine direkte Verbindung zwischen Arteriolen und Sinus im Sinne einer „geschlossenen Zirkulation“. Andere Autoren (Murakami et al. 1973) liefern jedoch Hinweise dafür, dass dieses Prinzip bei Ratten vorkommt.

Die Unterteilung des Milzparenchyms in eine rote und weiße Pulpa besitzt auch beim Menschen Gültigkeit. Auch hier akkumulieren die B-Zellen in Follikeln, während sich die T-Zellen hauptsächlich um die Arteriolen gruppieren (Hsu et al. 1983; Timens und Poppema 1985). Die periarteriolen T-Zellscheiden (PALS) sind beim Menschen jedoch weitaus weniger regelmäßig angeordnet als bei Nagern (van Krieken und te Velde 1988). Mitunter scheint die PALS sogar durch B-Zellen ersetzt zu sein, und man beobachtet Arteriolen, die durch die Korona oder sogar durch das Keimzentrum eines Follikels ziehen (van Krieken und te Velde 1988; Steiniger und Barth 2000).

Während das Keimzentrum und die Korona von Follikeln in der Ratten- und Humanmilz im Wesentlichen gleich aufgebaut sind, finden sich in der Struktur der Marginalzone einige Unterschiede. Die Marginalzone tritt beim Menschen fast nur in der Umgebung von Follikeln auf (Timens 1991; Steiniger und Barth 2000). Sie besteht wie bei Ratten aus IgM⁺ IgD⁻ oder schwach IgD⁺ B-Gedächtniszellen (Spencer et al. 1998; Steiniger et al. 2001) und wird durch spezialisierte Fibroblasten in ein inneres und ein äußeres Kompartiment unterteilt (Steiniger et al. 1997). Entlang dieser Fibroblasten ist häufig ein Ring aus T-Zellen angeordnet, die CD3 und CD4 exprimieren (Steiniger und Barth 2000). In einigen Fällen beobachtet man im äußeren Bereich der Marginalzone ringförmig angeordnete IgD⁺ B-Zellen, die sich entlang der PALS fortsetzen (Steiniger et al. 2001).

Als viertes Kompartiment eines Sekundärfollikels in der Humanmilz wurde neben Keimzentrum, Korona und Marginalzone die sogenannte perifollikuläre Zone erstmals von van Krieken et al. (1985a) sowie von van Krieken und te Velde (1986 und 1988) definiert. Die Autoren beschreiben diese Region als ein Netz aus retikulären Fasern, das sowohl die Follikel als auch die PALS umgibt. Die Maschen dieses Netzes sind weiter als in den Marksträngen der roten Pulpa. Steiniger und Barth (2000) entwickeln die Hypothese, dass Seitenäste der Zentralarteriolen die perifollikuläre Zone mit Blut versorgen. Die perifollikuläre Zone würde somit ein Teil des offenen Kreislaufsystems der Milz darstellen. Während Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten von hier aus die rote Pulpa erreichen, könnten Lymphozyten durch die Marginalzone in die PALS oder in die Korona einwandern.

Die Architektur des arteriellen Gefäßbaums der Milz unterscheidet sich beim Menschen in einigen Details von den Verhältnissen bei Ratten. Auch die Humanmilz wird von Ästen der Arteria splenica versorgt. Beim Menschen finden sich aber, anders als bei Ratten, Trabekelarterien (Steiniger und Barth, 2000). Es wird angenommen, dass die Arteriolen beim Menschen nach dem Verlassen der Bindegewebstrabekel von einer PALS ummantelt werden und sich dann als Zentralarteriolen bezeichnen lassen. Diese Gefäße verzweigen sich weiter und enden schließlich als Kapillaren, die von spezialisierten Makrophagen umgeben sind. Diese als Hülsekapillaren bezeichneten Gefäße finden sich in der perifollikulären Zone und in der roten Pulpa (van Krieken und te Velde 1988). Manche Autoren (Kashimura und Fujita 1987) berichten, dass sich die Arteriolen in der weißen Pulpa der Humanmilz nicht aufzweigen. Die genauen Verhältnisse sind aber bislang immer noch ungeklärt.

Schmidt et al. (1988, 1993) beobachteten auch in der Milz des Menschen einen Marginalsinus, nämlich an der Grenze zwischen Follikel und Marginalzone. Demgegenüber kommen andere Autoren (van Krieken et al. 1985a; Sasou et al. 1986; Steiniger und Barth 2000) zu dem Ergebnis, dass die menschliche Milz im Gegensatz zu Ratten keinen Marginalsinus aufweist.

Die Struktur der roten Pulpa unterscheidet sich beim Menschen im Wesentlichen nicht von den Verhältnissen bei Ratten. Auch in der Humanmilz finden sich sowohl Sinus als auch ein Netzwerk aus Marksträngen, das Erythrozyten,

Lymphozyten und eine große Anzahl von Makrophagen beherbergt (van Krieken et al. 1985b). Es wird angenommen, dass das Blut auch in der menschlichen Milz aus dem System der Pulpastränge durch Schlitze zwischen den Endothelzellen in die Sinus hineinfließt (Fujita 1974; Fujita et al. 1982). Ob in der Humanmilz neben diesem „offenen“ Teil der Zirkulation auch ein „geschlossener“ Teil mit einem kontinuierlichen Blutfluss in die Sinus erfolgt ist noch Gegenstand der Diskussion. Während Saitoh et al. (1982) und van Krieken et al. (1985b) keinen Hinweis dafür erkennen, schließen Schmidt et al. (1988) aus ihren Untersuchungen, dass in der Milz des Menschen beide Möglichkeiten der Zirkulation vorhanden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Paraffinserienschnitte eines Präparates aus einer repräsentativen humanen Milz angefertigt. Die Schnitte wurden abwechselnd mit Antikörpern gegen B-Lymphozyten und gegen T-Lymphozyten gefärbt. Eine Gegenfärbung mit Hämalaun erfolgte, um glatte Muskelzellen der Arteriolen darzustellen. Die Präparate wurden mit einer digitalen Kamera aufgenommen und dann mit Hilfe von Datenverarbeitungsprogrammen dreidimensional rekonstruiert. Die Anwendung einer immunhistologischen Färbetechnik war notwendig, weil mit diesem Verfahren sowohl die B- und T-Zellareale als auch die Blutgefäße in einer hohen Detailerkennbarkeit dargestellt werden konnten. Die Anwendung konfokaler Bildgebungsverfahren schied aus, weil die Tiefenausdehnung des zu rekonstruierenden Bereichs mit ca. 1000µm die maximale Eindringtiefe eines Laserstrahls in eine Gewebeprobe um ein Vielfaches überstieg. Die zahlreichen Schwierigkeiten, die mit der Erstellung von dreidimensionalen Rekonstruktionen aus einer großen Anzahl von Serienschnitten verbunden sind, werden im Diskussionsteil dieser Arbeit ausführlich erläutert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einige bislang ungeklärte Fragen zur mikroskopischen Architektur der humanen Milz zu beantworten:

1. Sind Arteriolen immer von einer soliden PALS umgeben oder wird das T-Zellareal teilweise durch die Follikel unterbrochen?
2. Können sich Arteriolen innerhalb der weißen Pulpa aufzweigen?
3. Wie sind die T-Zellen in der Marginalzone der Follikel angeordnet?
4. Wie stellen sich die rezirkulierenden B-Zellen in der Nähe der PALS dar?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Humanmilz

Das verwendete Milzpräparat wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. P. Barth, Institut für Pathologie der Universität Marburg, zur Verfügung gestellt. Das Organ war einer 21-jährigen polytraumatisierten Frau entnommen worden, bei der keine weiteren Erkrankungen bekannt waren. Die mikroskopische Struktur des Präparates entsprach dem für diese Altersgruppe typischen Bild.

2.2 Primärantikörper

Der monoklonale Antikörper L26 und die affinitätsgereinigten polyklonalen Kaninchen anti-CD3 Antikörper wurden von der Firma DAKO, Hamburg bezogen (Nr. M0755 für L26 und Nr. A0452 für anti-CD3).

L26 ist gegen das CD20-Antigen auf humanen B-Zellen gerichtet (Mason et al. 1990). Die polyklonalen Antikörper reagieren mit einem intrazytoplasmatischen Abschnitt der CD3-Epsilon-kette humaner T-Zellen.

2.3 Antikörperrnachweissystem

Zum Nachweis des Primärantikörpers L26 wurde mit dem Elite ABC-Kit der Firma Vector, Burlingame, USA, gearbeitet (Nr. PK- 6102, bezogen über Fa. Alexis, Grünberg, Deutschland). Für die Detektion von anti-CD3 wurde statt des biotinylierten anti-Maus IgG Antikörpers ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper verwendet (Vector Nr. BA-100, Bezug über Alexis, Grünberg).

2.4 Sonstige Reagenzien

2.4.1 PBS (Phosphate buffered saline)

PBS wurde als zehnfach konzentrierte Stammlösung angesetzt: 1,37 mol NaCl (Riedel-de Haen, Nr. 31434), 0,027 mol KCl (Roth, Nr. 6781), 0,08 mol Na₂HPO₄ · 2H₂O (Merck, Nr. 6580), 0,015 mol KH₂PO₄ (Merck, Nr. 4873) wurden in 1000 ml Aq. bidest. gelöst, wobei der pH-Wert dieser Lösung bei etwa 7,4 lag. Nach

Verdünnung der Stammlösung wurde der pH-Wert mit 1 N HCl (Merck, Nr. 9057) auf einen Wert von 7,2 eingestellt.

2.4.2 TBS (Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline)

0,05 mol Tris(hydroxymethyl)aminomethan der Firma Roth (Nr. 4855.2) und 0,15 mol NaCl (Riedel-de Haen, Nr. 31434) wurden in 700 ml Aqua bidest. gelöst und mit 1N HCl (Merck, Nr. 9057) auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt. Dann wurde die Lösung mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.

2.4.3 Verdünnungslösung für die Primärantikörper

Die Primärantikörper wurden in PBS verdünnt, dem 1% BSA (Bovines Serumalbumin, Serva, Nr. 11930), 0,1% Natriumazid (Baker, Nr. 9099) und 0,00033% Avidin (Sigma, Nr. A-9275) zugesetzt waren. L26 wurde im Verhältnis 1:150, anti-CD3 im Verhältnis 1:80 verdünnt.

2.4.4 Verdünnungslösung für die Sekundärantikörper

Die Verdünnung der Sekundärantikörper erfolgte im Verhältnis 1:200 in einer Lösung aus PBS, 5% NRS (Normalrattenserum), 0,002% Biotin (Sigma, Nr. B-4501) und 0,002% Natriumazid (Baker, Nr. 9099).

2.4.5 Farbreaktionslösung

10 mg DAB (3,3'-Diaminobenzidin) in Tablettenform (Sigma Nr. D-5905) wurden in 20 ml TBS gelöst und bis zur Verwendung in Portionen zu jeweils 1 ml bei -20°C gelagert. Dann wurde aus 500 µl Aqua bidest. und 20 µl Perhydrol (Merck, Nr. 7209) eine 1,2%ige H₂O₂-Lösung hergestellt.

Unmittelbar vor der Farbentwicklung wurden 10 µl dieser Lösung zu 1000 µl der DAB-Lösung pipettiert.

2.5 Protokoll der immunhistologischen Färbungen

2.5.1 Paraffinschnitte

Milzstücke mit einer Kantenlänge von etwa 1cm wurden ca. 24 Stunden in 4%iger Formalinlösung in Leitungswasser fixiert und anschließend bis zum 70%igen Alkohol entwässert.

Die Paraffineinbettung wurde in einem Einbettautomaten durchgeführt. Nach Fortsetzung der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte eine Behandlung mit Benzoessäuremethylester (Roth, Nr. 6944.2) und schließlich die Einbettung in Paraplast (Sherwood Medical, Nr. 8889-501007).

Das Präparat wurde dann in einen Paraffinblock (Paraplast) gegossen, von dem schließlich mit dem Schlittenmikrotom 150 Serienschnitte angefertigt wurden.

Die Objektträger waren zur besseren Haftung der Schnitte zuvor mit 2%iger Silanlösung (3-Aminopropyl-Triethoxysilan, Sigma Nr. A-3648) beschichtet worden.

2.5.2 Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex Methode

Diese Methode beruht auf der Fähigkeit des Glycoproteins Avidin, mit vier Molekülen Biotin eine physikalische Verbindung einzugehen.

Für dieses Verfahren werden drei Reagenzien benötigt. Ein Primärantikörper bindet spezifisch an das zu bestimmende Antigen. Ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper weist diesen Primärantikörper nach. Schließlich wird aus Avidin und biotinylierter Peroxidase ein Komplex hergestellt, der an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet.

Die Reaktion der Peroxidase mit H_2O_2 führt dann zur oxidativen Polymerisierung von Diaminobenzidin und zum Niederschlag eines braunen Produkts.

2.5.3 Durchführung der Färbungen

Als erstes wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und in eine absteigende Alkoholreihe überführt.

Bei der Formalinfixierung entsteht durch Einwirkung des Formalins auf das im Gewebe gelöste Hämoglobin störendes, sog. Formolpigment. Um dieses zu entfernen, wurden die Schnitte mit einer gesättigten Pikrinsäurelösung (Merck,

Nr. 621) in 80%igem Ethanol 20 Minuten inkubiert und anschließend die Pikrinsäurereste durch Waschen in 80%igem Ethanol entfernt.

Nach Spülen mit Aq. bidest. wurden die Objekte zur Antigendemaskierung mit 0,05%iger Protease Typ XIV, (von Streptomyces griseus, Sigma Nr. P-5147) 15 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde mit PBS gespült. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 0,15%iger H₂O₂-Lösung in PBS (Perhydrol von Merck, Nr. 7209), um eventuell vorhandene Peroxidase im Gewebe zu blockieren.

Nach nochmaligem Spülen mit PBS wurden die Objekte mit 50µl der Primärantikörperlösungen (vgl. Abschnitt 2.2 und 2.4.3) 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Serienschritte wurden abwechselnd mit dem Antikörper L26 (B-Zellen) und anti-CD3 (T-Zellen) gefärbt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objekte wieder mit PBS gewaschen.

Jetzt erfolgte die Inkubation mit 50µl der Sekundärantikörperlösungen (vgl. Abschnitt 2.3 und 2.4.4) für 30 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur.

Nach dem Spülen mit PBS wurden die Schnitte mit dem ABC-Reagenz (Vectastain Elite ABC-Kit, Nr. PK 6102) bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Die AB-Lösung wurde - nach Anweisung des Herstellers - 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt, indem Lösung A in PBS im Verhältnis 1:50 verdünnt und dann Lösung B ebenfalls im Verhältnis 1:50 zugesetzt wurde.

Nun wurde mit TBS gespült und danach 10 Minuten bei Raumtemperatur mit der Farbreaktionslösung (vgl. Abschnitt 2.4.5) inkubiert. Nach dem Spülen mit TBS folgte die Kernfärbung mit Hämalaun, von der die Negativkontrollen ausgespart blieben.

Schließlich wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, für 5 Minuten in Xylol eingetaucht und in Eukitt eingedeckt.

2.5.4 Negativkontrollen

Die ersten beiden Schnitte der Serie wurden als Negativkontrollen im ersten Färbeschnitt mit der Verdünnungslösung der Primärantikörper 30 Minuten inkubiert.

Im zweiten Schritt wurde einer der beiden Schnitte mit dem biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper und der andere mit dem biotinylierten Ziege-anti-Maus Antikörper jeweils 60 Minuten inkubiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Sekundärantikörper keine unspezifischen Bindungen eingingen.

2.6 Dreidimensionale Rekonstruktion der weißen Milzpulpa

2.6.1 Vorbereitung des Paraffinblocks

Um die Serienschnitte zur Rekonstruktion aufeinander ausrichten zu können, war es erforderlich, das Milzstück mit einer Markierung zu versehen. Dazu wurde vor dem Schneiden aus dem Block ein rechter Winkel so herausgefräst, dass das Objekt am Rand von den beiden Kanten des Winkels erfasst wurde. Jetzt wurde der Paraffinblock noch einmal eingeschmolzen und das Organstück erneut eingebettet, damit es beim Schneiden von allen Seiten mit Paraffin umgeben war (vgl. Abb.1).

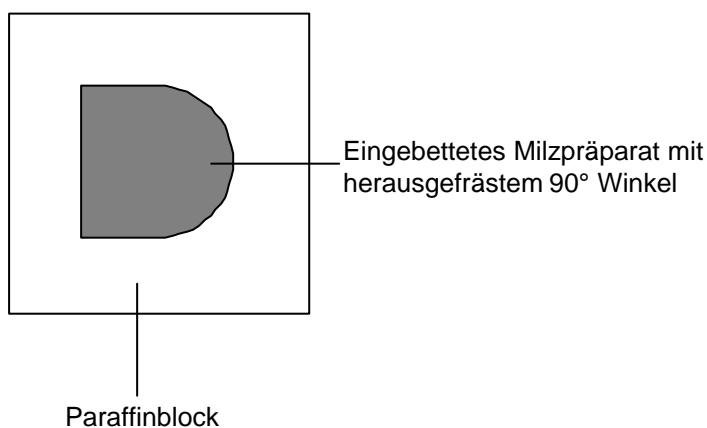


Abb.1: Paraffinblock mit eingebettetem Milzpräparat, aus dem zur Markierung ein Winkel von 90° herausgefräst wurde.

2.6.2 Bildbearbeitung

Die Serienschnitte wurden zunächst mit Hilfe eines Mikroskopes (Zeiss, Axioplan 2) und einer 3 Chip RGB-Videokamera (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching) aufgenommen. Für die Aufnahmen wurde ein Objektiv von Zeiss (Achromplan 4x/0,10) verwendet, sowie im Mikroskop ein Optovar mit dem Vergrößerungsfaktor 1,25 zugeschaltet. Außerdem kam das Bildverarbeitungsprogramm „Openlab“ (Version 1.7.8, Improvision Deutschland, Heidelberg-

Wieblingen) zum Einsatz, das auf einem Apple-Macintosh Computer (Power Macintosh 9500/200) installiert war.

Die einzelnen Objektträger wurden mit dem Kreuztisch des Mikroskops solange verschoben, bis der rechte Winkel des jeweiligen Präparats in der linken unteren Ecke des Computermonitors positioniert war. Nach diesem Schritt wurde das Objekt mit der digitalen Kamera aufgenommen. Mit Hilfe des Programms „Openlab“ konnten die Bilder nun übereinandergelagert werden. Die auf das erste Bild folgenden Bilder wurden transparent gemacht und mit Hilfe der angeschnittenen Arteriolen aufeinander ausgerichtet. Die verwendete Version 1.7.8. von „Openlab“ ermöglichte nur Verschiebungen in x- und y-Richtung, aber keine Drehung der Aufnahmen. Durch Drehung wäre eine präzisere Ausrichtung der Präparate möglich gewesen.

Bei einer ersten Durchsicht der Präparate wurden die Milzfollikel ausgewählt, deren B- und T-Zellregionen mit ihren Arteriolen dreidimensional rekonstruiert werden sollten. Die T- und B-Zellfärbungen wurden abwechselnd bearbeitet. „Openlab“ besitzt ein Schneidewerkzeug, mit dem die Strukturen, die in die Rekonstruktion aufgenommen werden sollten, ausgeschnitten und kopiert wurden. Diese Kopien wurden in zwei neue Dateien eingefügt. Auf diese Weise entstand eine Datei mit 71 Bildern von B-Zellen und den zugehörigen Blutgefäßen sowie eine zweite Datei mit 69 Aufnahmen von T-Zellen mit den entsprechenden Arteriolen. Zehn Präparate konnten nicht bearbeitet werden, weil sie beim Färbeprozess beschädigt wurden.

Die dreidimensionale Rekonstruktion der Schnitte wurde mit dem Programm „3D-Doctor“ (Version 2.0, Able Software Corp., Lexington, USA) durchgeführt. Zuerst wurden die mit Hilfe von „Openlab“ erzeugten Bilder, die im „Bitmap“-Format abgespeichert waren, in „3D-Doctor“ aufgerufen. Dies geschah mit den Funktionen „new stack“ und „add files“. Die Bilddateien wurden markiert, geöffnet und als sog. „List“-Datei neu abgespeichert. Mit der Funktion „open image“ wurden die Bilder dann erneut aufgerufen und die B- und T-Zellen sowie die Arteriolen, als zu rekonstruierende Objekte definiert. Dies ermöglichte der Editor mit der Funktion „object-setting“ und der Unterfunktion „object-management“. Voraussetzung für die Erstellung einer Rekonstruktion durch das Programm war die Umrandung der Strukturen, die in die Berechnung Eingang finden sollten. Zunächst wurden die definierten Objekte mit Hilfe der Symbolleiste aufgerufen.

Dann wurden sie im Menü „3D-Rendering“ mit der Unterfunktion „Interaktive Segmentation“ markiert. Dazu musste auf einer Skala ein Minimal- und auf einer zweiten ein Maximalwert für die sog. „Image-Thresholds“ eingestellt werden. Die Einstellungen waren dabei solange zu verändern, bis das jeweilige Objekt rot gefärbt erschien, d.h. markiert war. Für die Arteriolen betrugen beide Werte 255. Für die B- und T-Zellen betrug der Minimalwert 5 und der Maximalwert 250. Ein markiertes Objekt konnte dann vom Programm umrandet werden. Für die Blutgefäße wurde hierzu der Befehl „outline only“ angewendet. Die Umrandung der Zellen erfolgte mit der Funktion „all boundary lines“, weil hier nicht nur die Außenkontur, sondern alle Konturen markiert werden sollten. Die Farbe der Markierungen war zuvor im Menü „object-management“ bei der Definition der Objekte festgelegt worden. Für die B- und T-Zellen wurde Rot, für die Arteriolen Blau gewählt. Mit der Umrandungsfarbe war gleichzeitig die Farbe der rekonstruierten Strukturen festgelegt worden. Die so präparierten Bilder konnten nun dem Prozess der dreidimensionalen Rekonstruktion unterzogen werden.

„3D-Doctor“ bietet hierzu zwei unterschiedliche Verfahren an. Die Funktion „volume-rendering“ berücksichtigt nicht nur die Oberfläche der Objekte, sondern alle Daten der Strukturen. Demgegenüber wird bei der Funktion „surface-rendering“ nur die Oberfläche zur Erstellung der Rekonstruktion verwendet. Für die in dieser Arbeit vorgelegte Fragestellung zeigte sich „surface-rendering“ als die Methode, mit der sich die aussagefähigsten Ergebnisse erzielen ließen. Deshalb wurde mit dieser Funktion gearbeitet. Die „surface-rendering“-Methode bietet wiederum zwei Unterfunktionen: „simple surface-rendering“ und „complex surface-rendering“ mit den Möglichkeiten „fast rendering“ und „full rendering“. Eigene Versuche zeigten, dass die Anwendung der Funktion „complex surface rendering“ mit der Unterfunktion „full rendering“ die detailliertesten Bilder lieferte. Die Oberflächen der B- und T-Zellrekonstruktionen wurden mit Hilfe des Menüs „Property“ und seinen Unterfunktionen „Material“ sowie „object-setting“ transparent gestaltet. Dadurch wurde der Blick auf den Verlauf der Blutgefäße frei.

3 ERGEBNISSE

Die vorliegenden Rekonstruktionen entstanden durch die computerunterstützte Bearbeitung von immunhistologisch gefärbten und mit Hämalaun gegengefärbten Paraffinserienschnitten. Insgesamt wurden 150 Schnitte abwechselnd mit dem Antikörper L26 (spezifisch gegen CD20 positive B-Zellen) und einem Antiserum gegen CD3-positive T-Lymphozyten gefärbt. Der Antikörper L26 färbt alle B-Zellen und erlaubt es deshalb nicht, in den Follikeln Marginalzone, Korona oder Keimzentren zu unterscheiden. Diese Kompartimente der B-Zellregion sind jedoch durch die unterschiedliche Kernfärbung in den gegen CD3 gefärbten Schnitten erkennbar. Nach Abzug von beschädigten Präparaten standen für die Rekonstruktion 71 B- sowie 69 T-Zellfärbungen zur Verfügung. Die Lymphfollikel einerseits sowie die PALS andererseits wurden getrennt voneinander jeweils mit dem dazugehörigen Gefäßbaum rekonstruiert. Die künstliche Trennung war notwendig, um eine übersichtliche Darstellung zu ermöglichen.

Die komplizierten dreidimensionalen Verhältnisse der zellulären und vaskulären Strukturen sind nur zu verstehen, wenn man die Objekte aus verschiedenen Perspektiven betrachtet. Als Ausgangsposition wurde dazu sowohl bei der B- als auch bei der T-Zelldarstellung jeweils eine Stellung der Objekte als Frontalansicht festgelegt. Sie ermöglichte die bestmögliche Übersicht über die Strukturen. Es wurde zunächst eine nicht transparente Darstellung gewählt, um die Oberflächenstruktur sichtbar zu machen (Abb.2 und 17). Ausgehend von dieser Position wurden die Zellformationen um 15° im Uhrzeigersinn gedreht und um 25° nach vorne gekippt (Abb.3 und 18). Dann erfolgte jeweils die Darstellung in der transparenten Form, die den Blick auf die Arteriolen freigibt (Abb.4, 5, 21 und 22). Die Kippung der Modelle ermöglichte eine weitestgehend überlagerungsfreie Darstellung der Arteriolen. Bei einer weiteren Darstellungsform wurden die Zellformationen schließlich, von der Frontalansicht ausgehend, um 90° nach rechts gedreht und wiederum durchsichtig dargestellt (Abb.8 und 23). Zur Beschreibung der Strukturen war die Benutzung von Richtungsbegriffen erforderlich. Die Definitionen „oben“ und „unten“ sowie „rechts“ und „links“ wurden in den Frontalansichten (Abb.2 und 17) festgelegt. Die Lagebezeichnungen „vorne“ und „hinten“ wurden in den Seitenansichten (Abb.8 und 23) definiert.

In den beiden folgenden Kapiteln wird jeweils zunächst ein Überblick über die rekonstruierten B- bzw. T-Zellareale gegeben. Dann wird die Architektur der Zellanordnung und des arteriellen Gefäßsystems im Detail analysiert. Dazu wurden vier horizontale Ebenen in den dreidimensionalen Rekonstruktionen gelb markiert und spezieller beschrieben. Es wurden solche Ebenen ausgewählt, die sich besonders dazu eignen, durch einen Vergleich mit den entsprechenden immunhistologischen Ausgangsbildern bestimmte Befunde zu verdeutlichen.

Bei der Betrachtung der histologischen Bilder stellte sich heraus, dass einige Bereiche der weißen Pulpa sowohl von T- als auch von B-Lymphozyten besiedelt sind. Dies ist aber in den dreidimensionalen Rekonstruktionen nicht immer eindeutig zu erkennen. Ebenso ließen sich einige weitere Details innerhalb der Zell- und Gefäßstrukturen nicht immer zweifelsfrei durch Analyse der räumlichen Modelle aufdecken. Deshalb war es erforderlich, neben den oben beschriebenen vier Ebenen weitere immunhistologische Präparate der Schnittserie detaillierter darzustellen. Bei der Beschreibung der histologischen Bilder zeigte sich erneut die Notwendigkeit, Richtungsbezeichnungen zu verwenden. Dazu wurden die bei der Betrachtung der räumlichen Modelle festgelegten Lagebegriffe übernommen. Strukturen, die sich auf einer immunhistologischen Aufnahme „unten“ befinden, sind also dem „vorderen“ Abschnitt eines Follikels, bzw. einer T-Zellregion zuzuordnen und umgekehrt, d.h. Objekte im „oberen“ Bildabschnitt befinden sich in den Rekonstruktionen entsprechend „hinten“. Die Präparate werden im Folgenden in Richtung des Blutflusses, d.h. von „oben“ nach „unten“ analysiert.

3.1 Die dreidimensionale Rekonstruktion der Lymphfollikel und des Gefäßsystems

Durch die dreidimensionale Bearbeitung der 71 mit dem Antikörper L26 gefärbten Paraffinschnitte konnten insgesamt 2 Lymphfollikel vollständig, sowie ein weiterer zu ca. einem Drittel rekonstruiert werden. Diese Follikel wurden mit den Ziffern I, II und III bezeichnet. Die Follikel I und II besitzen annähernd die Form einer Kugel. Über die Gestalt von Follikel III kann aufgrund seiner unvollständigen Rekonstruktion keine Aussage gemacht werden (Abb.2 und 3). An den Follikel I schließt sich rechts eine Zellformation an, die mit Ia bezeichnet wurde (Abb.2 und 3). Hierbei handelt es sich um B-Zellen, die sich in Form einer Hülle um eine solide T-Zellregion legen. Aus dieser B-Zellanordnung entsteht Follikel II. Die beiden zuletzt genannten Befunde werden im Folgenden mit Hilfe der immunhistologischen Färbungen verdeutlicht (s.u.).

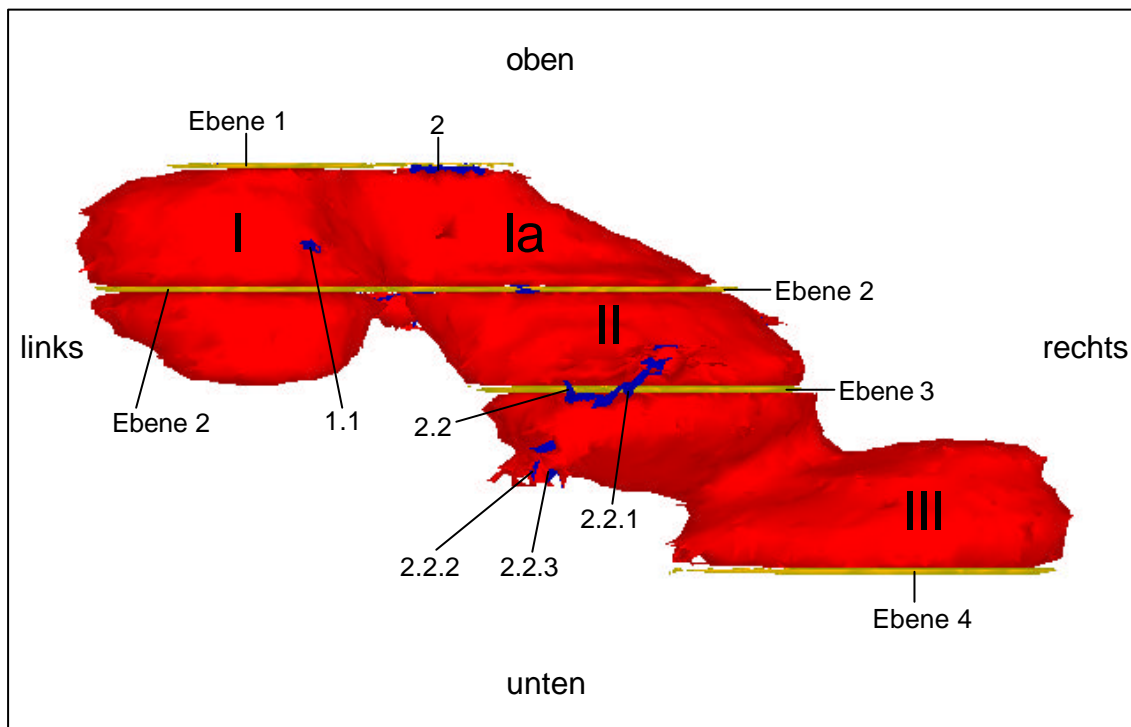


Abb.2: B-Zellareale in der Frontalansicht: Die Follikel sind mit den Ziffern I, II und III gekennzeichnet. Bei der Struktur Ia handelt es sich um B-Zellen aus der Marginalzone des Follikels I, die eine Hülle um eine solide T-Zellformation bilden (vgl. hierzu Abb.9). Die vier Schnittebenen, die mit den histologischen Ausgangsbildern verglichen werden, sind gelb markiert. Arteriolen, die aus den Follikeln in die umgebende rote Pulpa hinausragen, sind blau dargestellt. Ihr Verlauf innerhalb der B-Zellstrukturen wird in den Abb. 4 und 5 erkennbar.

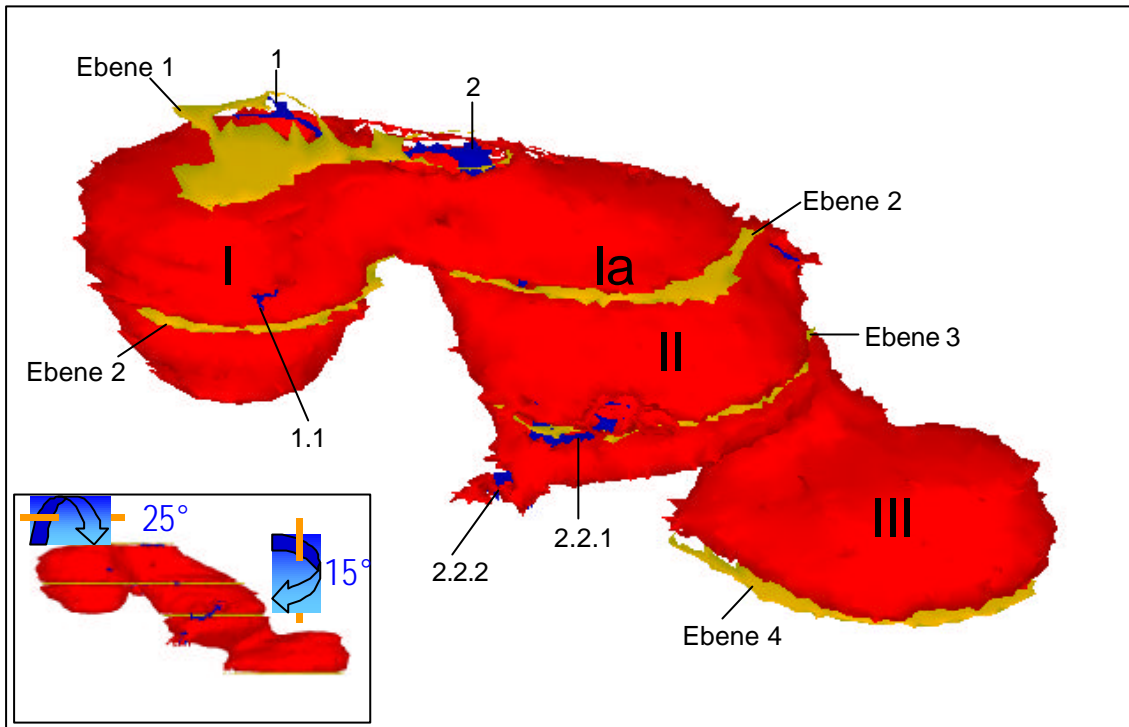


Abb.3: Die Follikel wurden von der Frontalansicht ausgehend um 15° nach rechts gedreht und um 25° nach vorne gekippt.

Alle dargestellten Blutgefäße besitzen stets eine oder mehrere Schichten glatter Muskelzellen und sind daher als Arteriolen anzusprechen. Die B-Zellareale werden von zwei Arteriolen durchzogen, die sich in ihrem Verlauf aufzweigen und mit den Ziffern 1 und 2 bezeichnet wurden (Abb.4 und 5).

Abb.6 zeigt die immunhistologische B-Zellfärbung der Schnittebene 1. Man erkennt die Anfänge des Follikels I. B-Zellen aus seiner Marginalzone umschließen die beiden Gefäße 1 und 2. Die V-förmige Struktur der Arteriole 1 deutet darauf hin, dass sie durch einen Zusammenschluss zweier Gefäße entsteht. Eine genauere Aussage ist jedoch nicht möglich, da es sich hier um den obersten Paraffinschnitt der Serie handelt. Aus der ovalen Form der Arteriole 2 lässt sich schließen, dass sich hier ein Gefäßast abzuschnüren beginnt. Tatsächlich handelt es sich dabei um die Verbindung zwischen den Gefäßen 1 und 2, die auf den Abb.4 und 5 zu erkennen ist. Bei dem Blutgefäß, das im linken oberen Bildausschnitt zu sehen ist, handelt es sich um eine Trabekelarterie. Das Gefäß links unterhalb der Arteriole 1 fand bei der dreidimensionalen Rekonstruktion keine Berücksichtigung, weil sich keine Verbindung zu Gefäß 1 erkennen ließ. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen tangential angeschnittenen Seitenast der Arteriole 1.

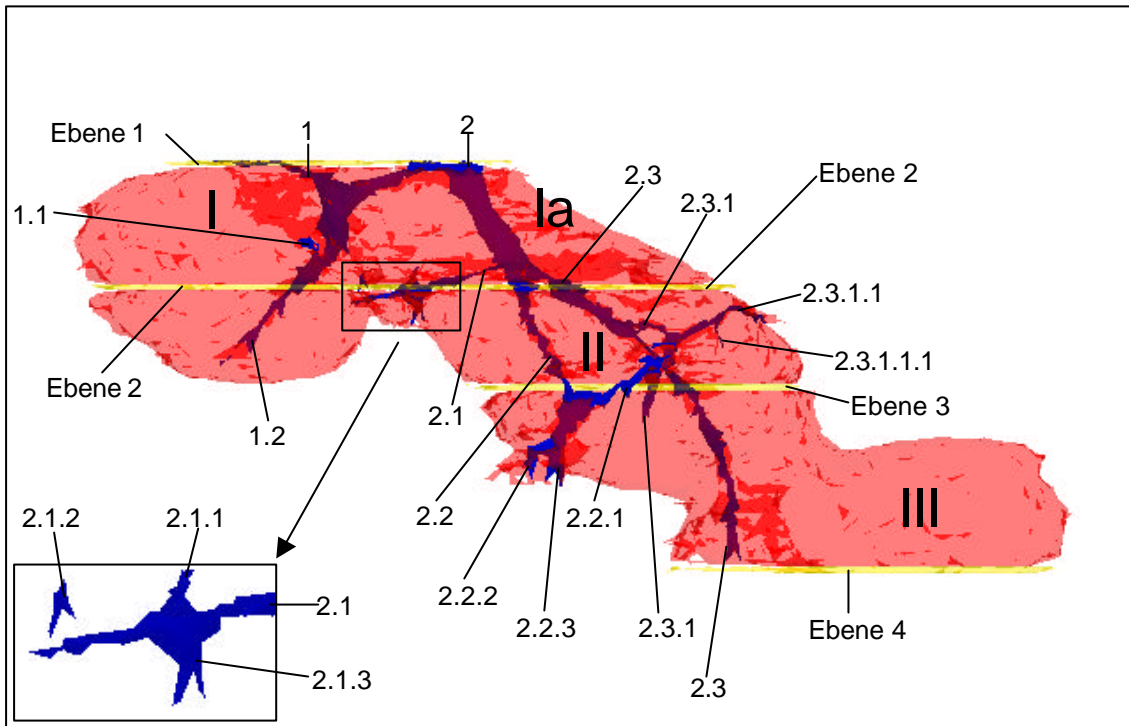


Abb. 4: Transparente Darstellung der Follikel I, II, und III in der Frontalansicht: Man erkennt zwei Hauptgefäßstämme, die in die B-Zellansammlungen eintreten und sich dort in unterschiedlichem Ausmaß verzweigen (s. Text). Die Detailvergrößerung zeigt die Verhältnisse im Bereich der Aufteilung der Arteriole 2.1. Die Gefäße 2.1.2 und 2.1.3 zeigen eine Aufspaltung. Hierbei handelt es sich aber um rechnerbedingte Artefakte.

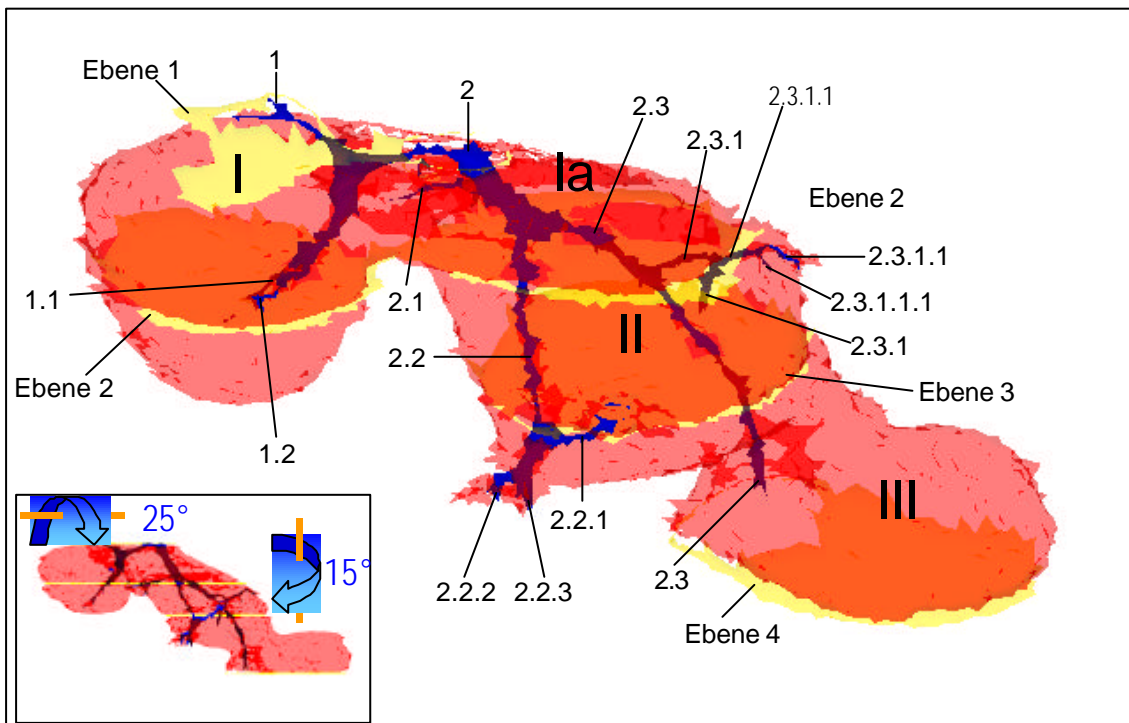


Abb. 5: Transparente Darstellung der aus der Frontalansicht (Abb. 4) um 15° nach rechts gedrehten sowie um 25° nach vorne gekippten Follikel. Hier ist eine weitestgehend überlagerungsfreie Darstellung der Arteriolen zu sehen.

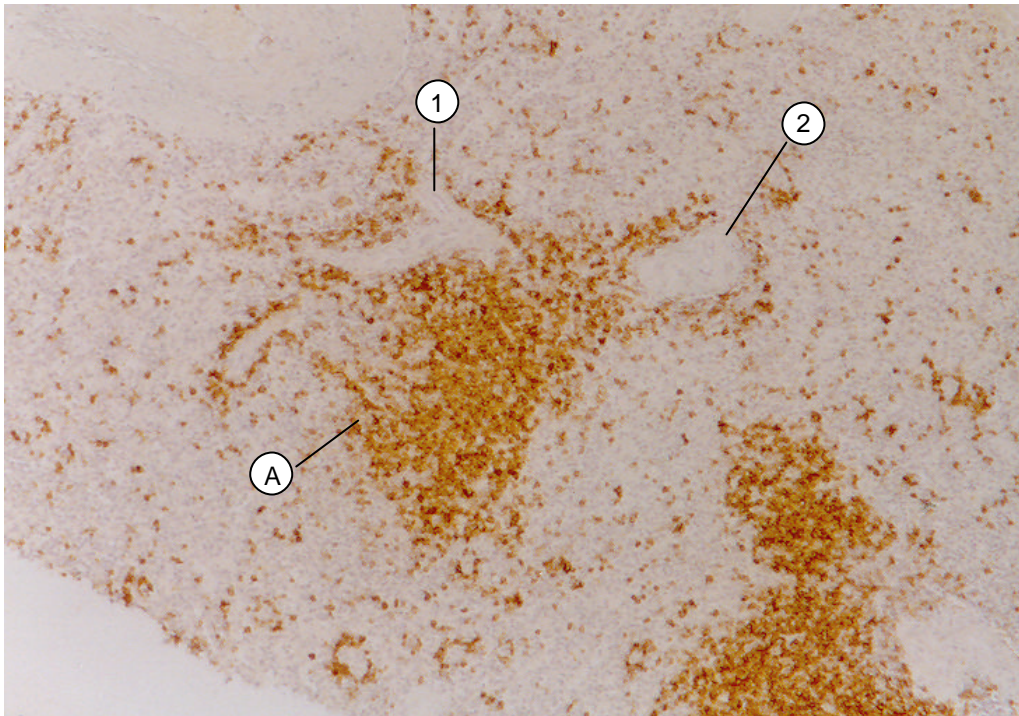


Abb.6: Immunhistologische Färbung von CD20 positiven B-Zellen der Schnittebene 1 (Endvergrößerung x 80): Man erkennt die Anfänge des Follikels I (A). BLymphozyten aus seiner Marginalzone umfassen die beiden Arteriolen 1 und 2.

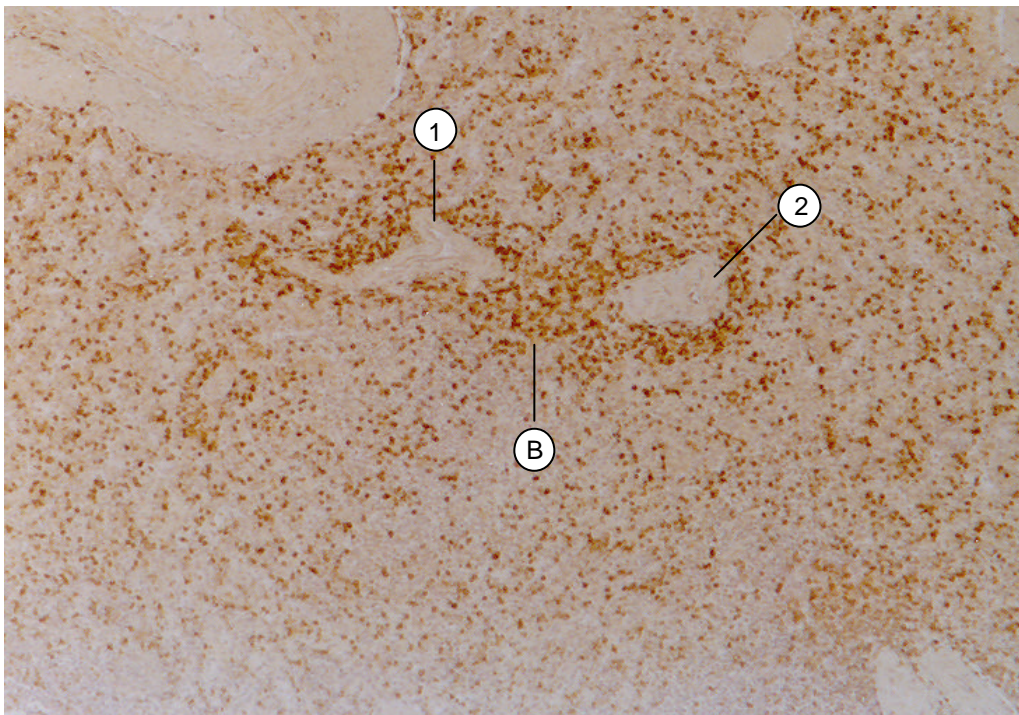


Abb.7: Färbung von CD3 positiven T-Zellen der Schnittebene 1 (Endvergrößerung x 80): T-Lymphozyten (B) umschließen die beiden Arteriolen 1 und 2. Beachte die periarteriolen Überlappungsbereiche von B- und T-Zellen, die beim Vergleich mit Abb.6 auffallen.

Abb.7 zeigt die korrespondierende T-Zellfärbung in der Schnittebene 1. Beim Vergleich beider Abb. fällt auf, dass sich die B- und T-Zellen in der Umgebung der beiden Gefäße 1 und 2 miteinander vermischen. Hier liegt offensichtlich eine aus T- und B-Zellen bestehende Zellscheide vor.

Die Arteriole 1 verzweigt sich etwa in der Mitte des Follikels I in die Gefäße 1.1 und 1.2. (Abb.4 und 8). Der Ast 1.1 verlässt Follikel I leicht ansteigend in Richtung der roten Pulpa während die Arteriole 1.2 nach unten durch ihn hindurch zieht (Abb.8). Dieses Gefäß scheint in den dreidimensionalen Rekonstruktionen im Follikel I zu enden (Abb.4). Dies ist darauf zurückzuführen, dass es auf den digitalisierten Aufnahmen in den unteren Follikelabschnitten nicht mehr eindeutig zu identifizieren war. Auf den lichtmikroskopischen Bildern lässt sich dieses Gefäß aber bis zum Ende des Follikels I nachweisen.

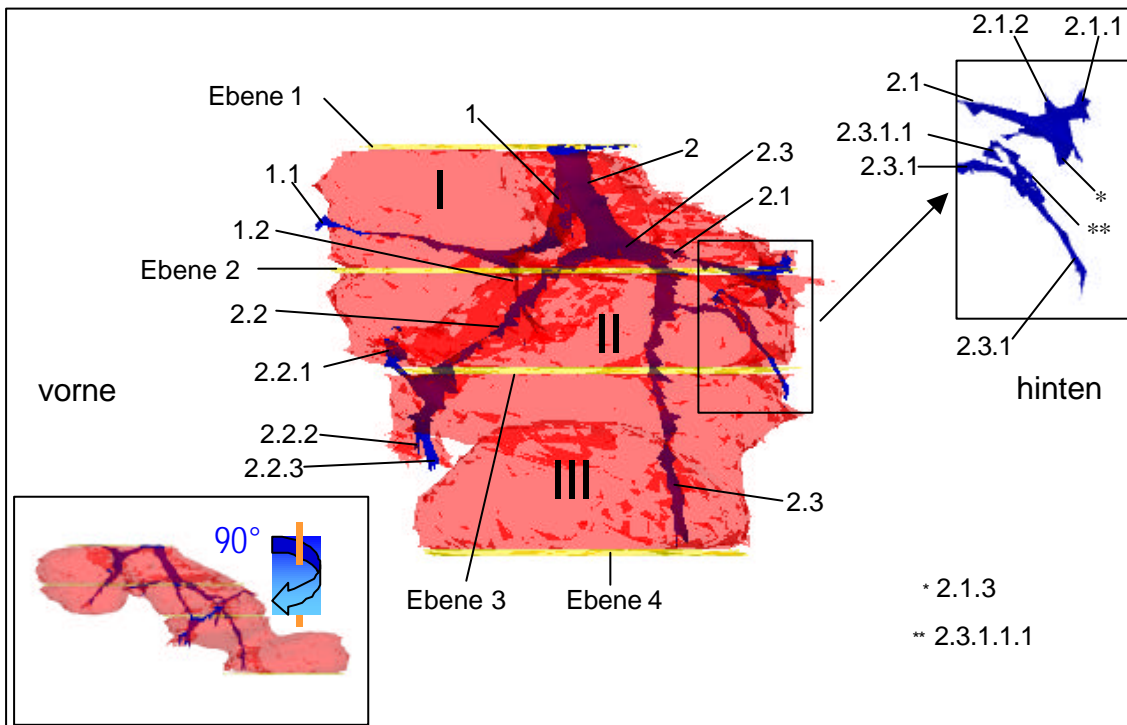


Abb.8: Transparente B-Zellformation von der Frontalansicht ausgehend um 90° nach rechts gedreht: Die Detailvergrößerung zeigt die Verhältnisse im Bereich der Aufzweigungen der Arteriolen 2.1 und 2.3.1

Die Arteriole 2 gibt das Gefäß 2.1 ab und teilt sich unmittelbar danach in die Äste 2.2 und 2.3 auf. (Abb.4, 5 und 8). Das Gefäß 2.1 zieht nach unten in Richtung der roten Pulpa und teilt sich hier in drei Äste auf, die mit den Nummern 2.1.1, 2.1.2 und 2.1.3 versehen wurden (Abb.4 und 8). Etwa in Höhe der Abzweigung der Arteriole 2.1 entsteht aus der hüllförmigen B-Zellanordnung Ia um die T-Zellscheide des Gefäßes 2 der Follikel II. Dies lässt sich auf der histologischen

Abb.9 erkennen. Auf der linken Seite befindet sich Follikel I. Bei den Gefäßen am rechten Follikelrand handelt es sich um die Arteriolen 1 und 1.1. Deutlich sind die B-Lymphozyten zu erkennen, die von der Marginalzone des Follikels I ausgehend ein ungefärbtes Zellareal ringförmig umfassen. Bei diesem Areal handelt es sich um T-Zellen, wie auf Abb.10 zu erkennen ist. Sie umschließen an dieser Stelle die Arteriole 2, die gerade den Ast 2.1 abgibt. Der B-Zellring ist Teil der Formation, die in der dreidimensionalen Rekonstruktion mit Ia bezeichnet wurde (Abb.2 und 3). Erst anhand des histologischen Bildes wird klar, dass es sich dabei nicht um eine solide Struktur, sondern um eine Hülle aus B-Zellen handelt. Am rechten Rand des B-Zellrings ist ein Bereich zu erkennen, in dem die B-Lymphozyten zu einer Scheibe akkumulieren (Abb.9). Dieser Region ist der Beginn des Follikels II zuzuordnen. Vergleicht man die Umgebung der Arteriolen 1, 1.1 und 2 auf den Abb.9 und 10, so fällt wie schon beim Vergleich der Abb.6 und 7 auf, dass auch in diesen Bereichen B- und T-Lymphozyten nicht streng voneinander getrennt sind, sondern vielmehr vermischt auftreten.

Die Abb.11 und 12 zeigen die immunhistologischen Färbungen der Schnittebene 2. Die B-Zellfärbung (Abb.11) stellt auf der linken Seite einen Schnitt durch das Zentrum des Follikels I mit der Arteriole 1.2 dar. Die B-Lymphozyten bilden eine homogene, fast kreisrunde Struktur. Lediglich in einzelnen Randbereichen sind nicht gefärbte Zonen zu erkennen. Hierbei handelt es sich um T-Zellzonen, wie ein Vergleich mit Abb.12 zeigt. Rechts im Bild erkennt man einen Schnitt durch Follikel II. Aus seiner Marginalzone ziehen B-Zellen ringförmig um ein ungefärbtes Gebiet, das Abb.12 als ein T-Zellareal in der Nähe des Follikels ausweist. An der Grenze zwischen B- und T-Zellregion befindet sich die Arteriole 2.3. Vor ihr liegt die Aufzweigung 2.2. Die tangential angeschnittene Arteriole 2.1 und ihre beiden Äste 2.1.1 und 2.1.2 werden von einem schmalen B-Zellstreifen umfasst. Auch in dieser Schnittebene lassen sich wieder Bereiche nachweisen, die sowohl von B- als auch von T-Zellen besiedelt sind. Diese Areale finden sich sowohl in den Marginalzonen der Follikel I und II als auch in der Umgebung der Arteriolen 2.2, 2.3 sowie im Bereich der Aufzweigungen 2.1, 2.1.1 und 2.1.2. Dies lässt sich durch einen Vergleich der beiden Abb.11 und 12 erkennen. Ähnlich wie in der Schnittebene 1 befinden sich also auch hier Zellscheiden um die Arteriolen, die sowohl aus B- als auch aus T-Lymphozyten bestehen.

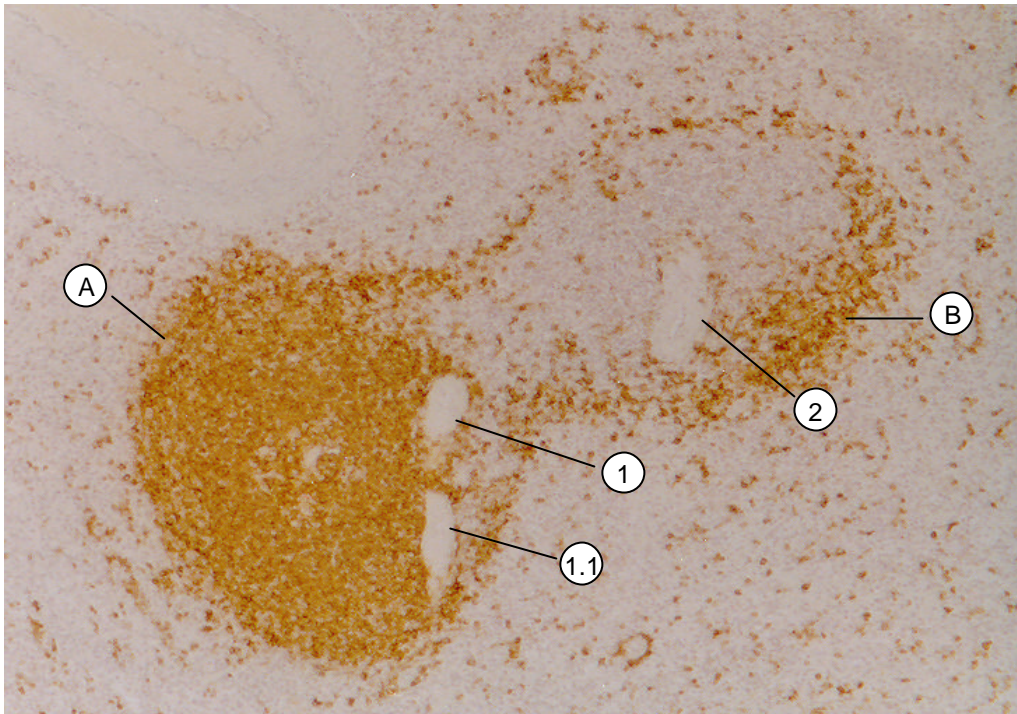


Abb.9: B-Zellfärbung in Höhe der Aufzweigung der Arteriole 2 (Endvergrößerung x 80): Aus der Marginalzone von Follikel I (A) ziehen B-Lymphozyten um ein solides T-Zellareal (vgl. Abb.10). Sie verdichten sich an einer Stelle (B). Diesem Bereich ist der Beginn des Follikels II zuzuordnen. Am rechten Rand des Follikels I befinden sich die Gefäße 1 und 1.1.

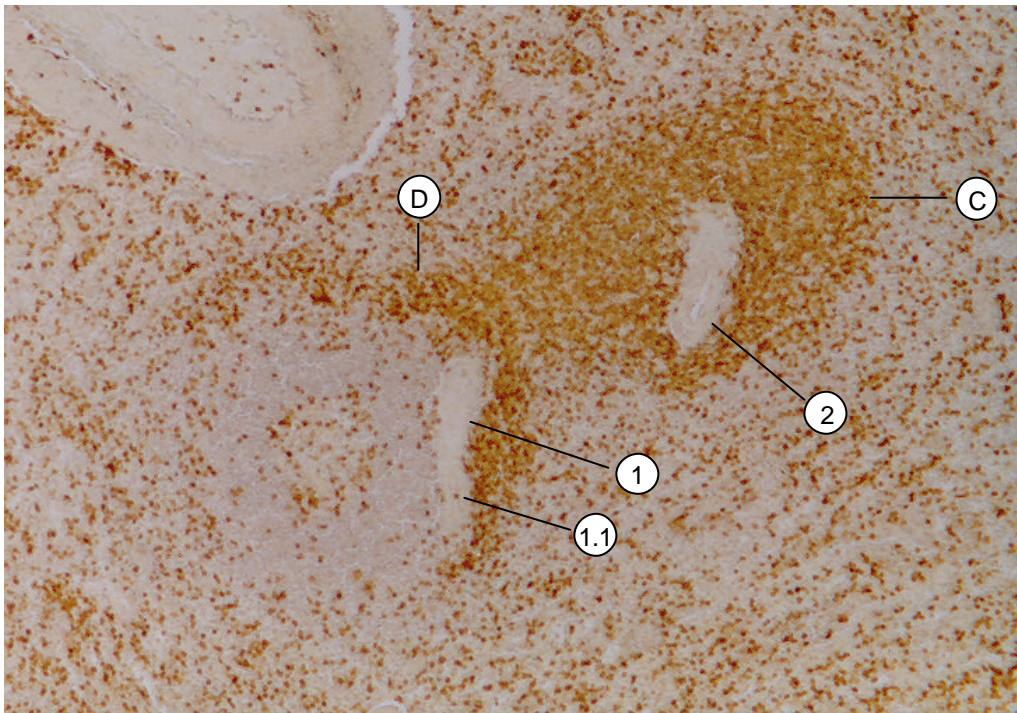


Abb.10: T-Zellfärbung in Höhe der Aufzweigung der Arteriolen 1 und 2 (Endvergrößerung x 80): Rechts findet sich die T-Zellscheide (C) um die Arteriole 2. Auf der linken Seite befinden sich ringförmig angeordnete T-Lymphozyten (D) in der Marginalzone des Follikels I (vgl. mit Abb.9). Aus der Arteriole 1 spaltet sich in dieser Schnittebene gerade der Seitenast 1.1 ab.

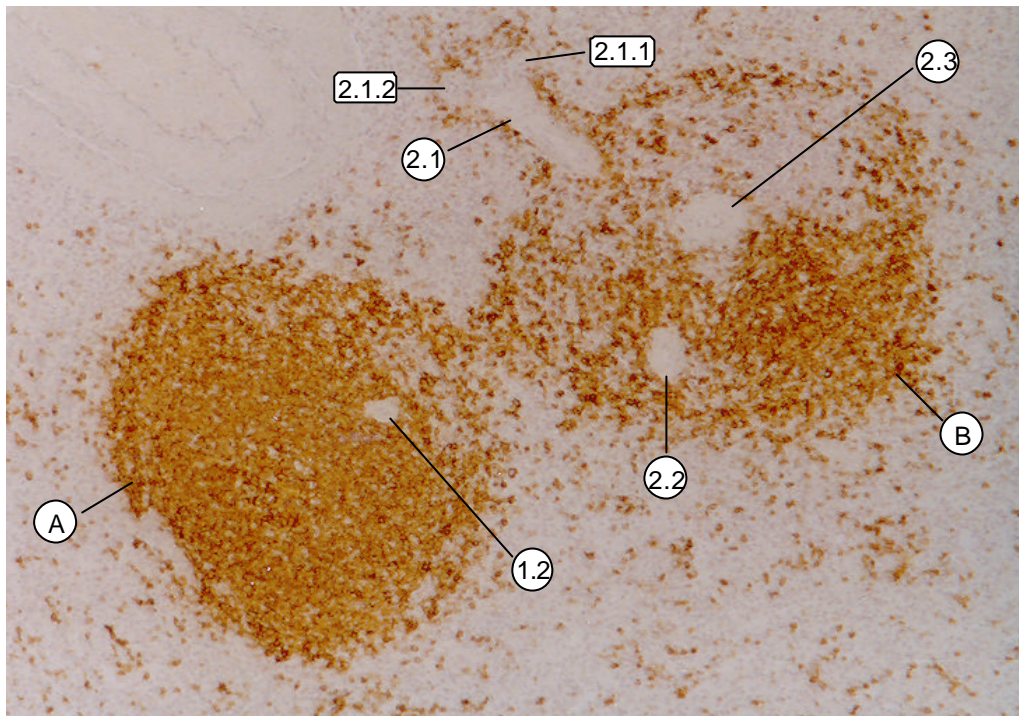


Abb.11: Färbung von B-Zellen in der Schnittebene 2 (Endvergrößerung x 80): Links erkennt man den Follikel I (A) mit der Arteriole 1.2. Auf der rechten Seite befindet sich ein Schnitt durch Follikel II (B) mit den Gefäßen 2.2 und 2.3. Im hinteren Bereich liegen die Seitenäste 2.1, 2.1.1 und 2.1.2

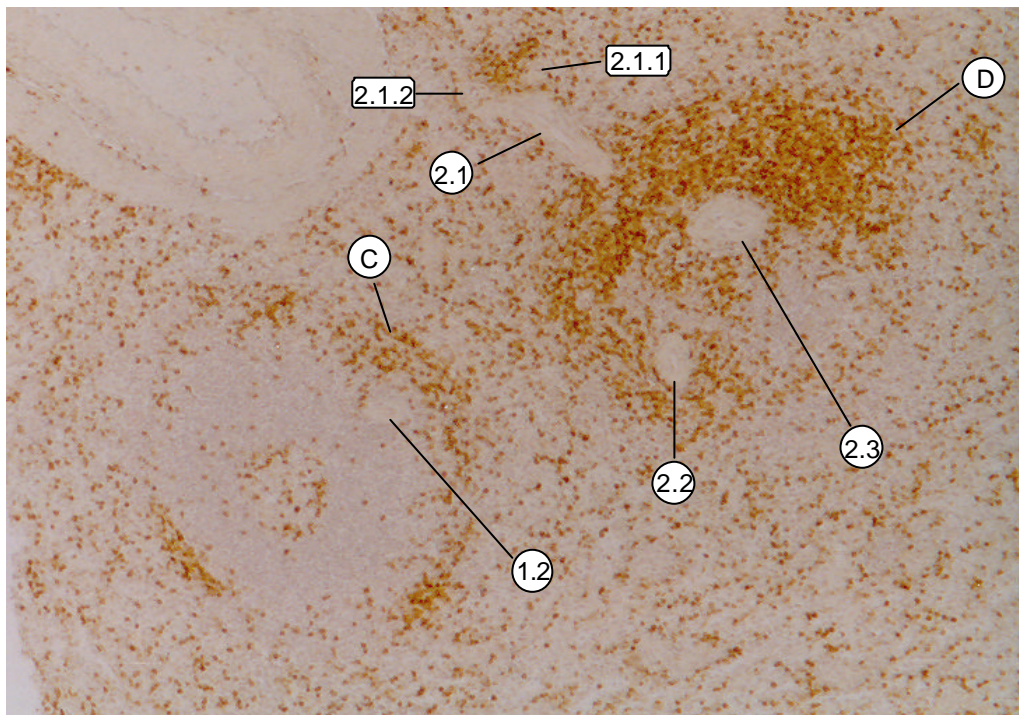


Abb.12: Färbung von T-Zellen in der Schnittebene 2 (Endvergrößerung x 80): Auf der linken Seite sind TLymphozyten (C) in der Marginalzone des Follikels I zu erkennen (vgl. mit Abb.11). Die Arteriole 1.2 befindet sich am Rand dieser Zellformation. Rechts im Bild befindet sich die T-Zellzone des Follikels II (D) mit den Gefäßen 2.2 und 2.3. In der roten Pulpa liegen die Arteriolen 2.1, 2.1.1 und 2.1.2.

Die Arteriole 2.2 durchzieht Follikel II, bis sie sich etwa zu Beginn seines letzten Drittels an der Grenze zur roten Pulpa weiter aufteilt. Hier zweigt das Gefäß 2.2.1 ab, bevor sich die Arteriole 2.2 in ihre Endäste 2.2.2 und 2.2.3 aufspaltet (Abb.5 und 8). Das Gefäß 2.3 gibt nach einer kurzen Strecke einen Seitenast 2.3.1 ab (Abb.5). Dieser verläuft zunächst horizontal und entlässt dann die Arteriole 2.3.1.1 (Abb.5), die den Follikel leicht schräg nach oben gerichtet verlässt (Abb.4 und 5). Zuvor gibt sie noch den Ast 2.3.1.1.1 ab (Abb.4 und 5). Die Arteriole 2.3.1 wiederum verlässt den Follikel II in bogenförmigem Verlauf in Richtung der roten Pulpa (Abb.8). Die Arteriole 2.3 durchläuft, nachdem sie den Ast 2.3.1 abgegeben hat, den Follikel II und setzt sich dann im Follikel III weiter fort (Abb.4 und 5).

Die Abb.13 und 14 zeigen die histologischen Verhältnisse der Schnittebene 3. Auf der B-Zellfärbung (Abb.13) ist zu erkennen, dass Follikel I in dieser Schnittebene nicht mehr vorhanden ist. Follikel II befindet sich rechts im Bild. Er besitzt eine näherungsweise kreisrunde Form. Vorne sind die Gefäße 2.2 und 2.2.1 zu erkennen. Bei dem ungefärbten Gebiet zwischen diesen beiden Gefäßen handelt es sich um ein T-Zellareal (Abb.14). Auch an dieser Stelle lässt sich wieder nachweisen, dass die B- und T-Zellpopulationen in Gefäßnähe nicht streng voneinander getrennt vorliegen, sondern sich durchmischen (vgl. Abb.13 und 14). Im hinteren Bereich des Follikels liegen die Arteriolen 2.3 und 2.3.1. In der Umgebung des Gefäßes 2.3 finden sich fast ausschließlich B-Zellen (Abb.13) und nur vereinzelt T-Zellen (Abb.14), d.h. dieses Gefäß verläuft inmitten des Follikels II. Demgegenüber zeigen sich im Bereich der Arteriole 2.3.1 erneut Überlappungsbereiche von B- und T-Lymphozyten (vgl. Abb.13 und 14).

Auf den Abb.15 und 16 ist die 4. Schnittebene zu sehen. Die Färbung gegen B-Lymphozyten (Abb.15) zeigt einen Schnitt durch den Anfangsbereich des Follikels III. Bei dem immunhistochemisch ungefärbten Gebiet handelt es sich um T-Zellen (Abb.16). B-Zellen aus der Marginalzone des Follikels III umschließen die T-Zellzone ringförmig. Diese Anordnung der B-Lymphozyten stellt eine Verbindung zwischen den beiden Follikeln II und III dar (Abb.2 und 3). Die Struktur ähnelt dem Übergangsbereich zwischen Follikel I und II (Abb.9). Das bedeutet, dass alle dargestellten Follikel über B-Zellhüllen, die sich um solide T-Zellareale legen, miteinander verbunden sind.

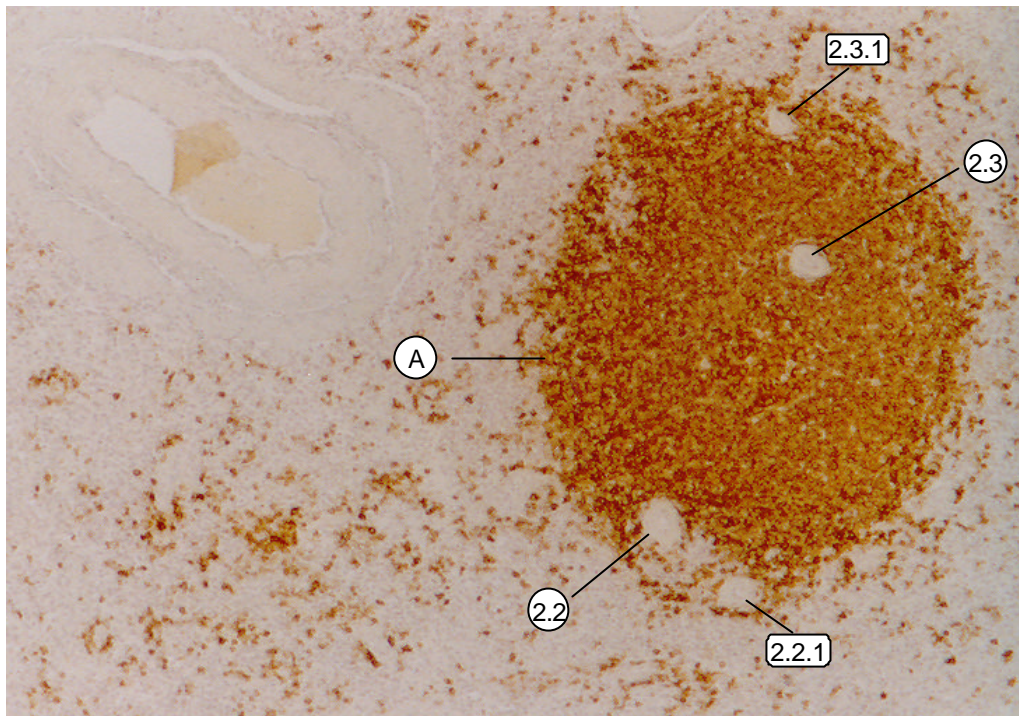


Abb.13: Färbung von B-Zellen in der Schnittebene 3 (Endvergrößerung x 80): Auf der rechten Bildhälfte ist Follikel II (A) mit den Arteriolen 2.2, 2.2.1, 2.3 und 2.3.1 zu erkennen.

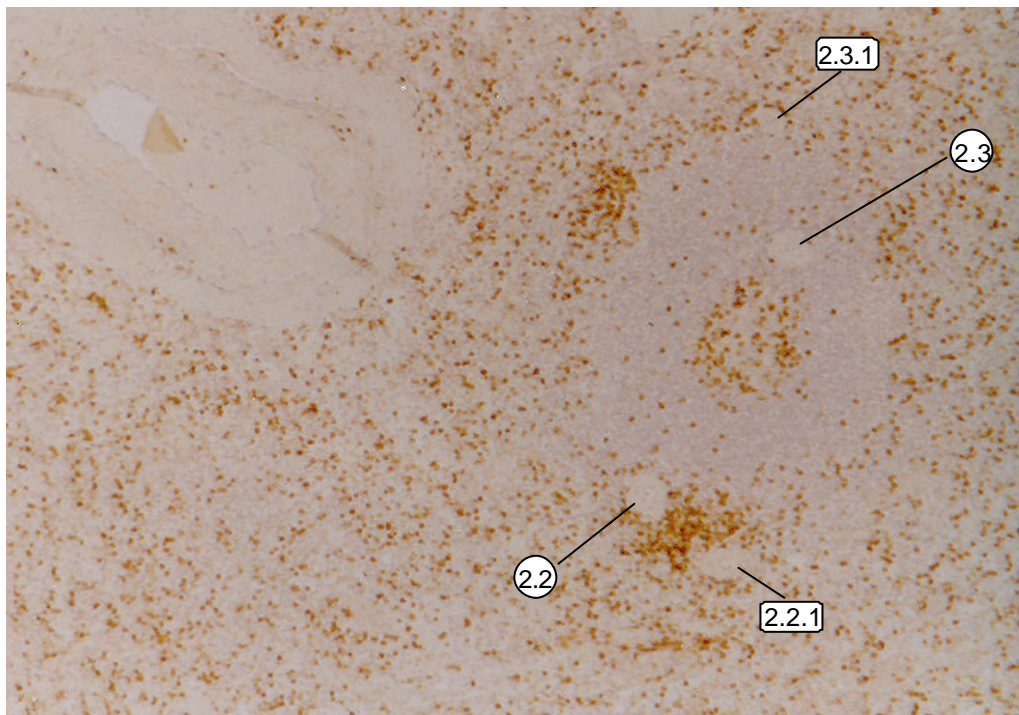


Abb.14: Färbung von T-Zellen in der Schnittebene 3 (Endvergrößerung x 80): In der Marginalzone des Follikels II finden sich T-Lymphozyten, die sich an einigen Stellen verdichten. Vorne befinden sich die Arteriolen 2.2 und 2.2.1, die von einer unvollständig ausgebildeten T Zellscheide umgeben sind. Die Arteriole 2.3 liegt in der Nähe des Follikelkeimzentrums. Im hinteren Abschnitt befindet sich der Ast 2.3.1.

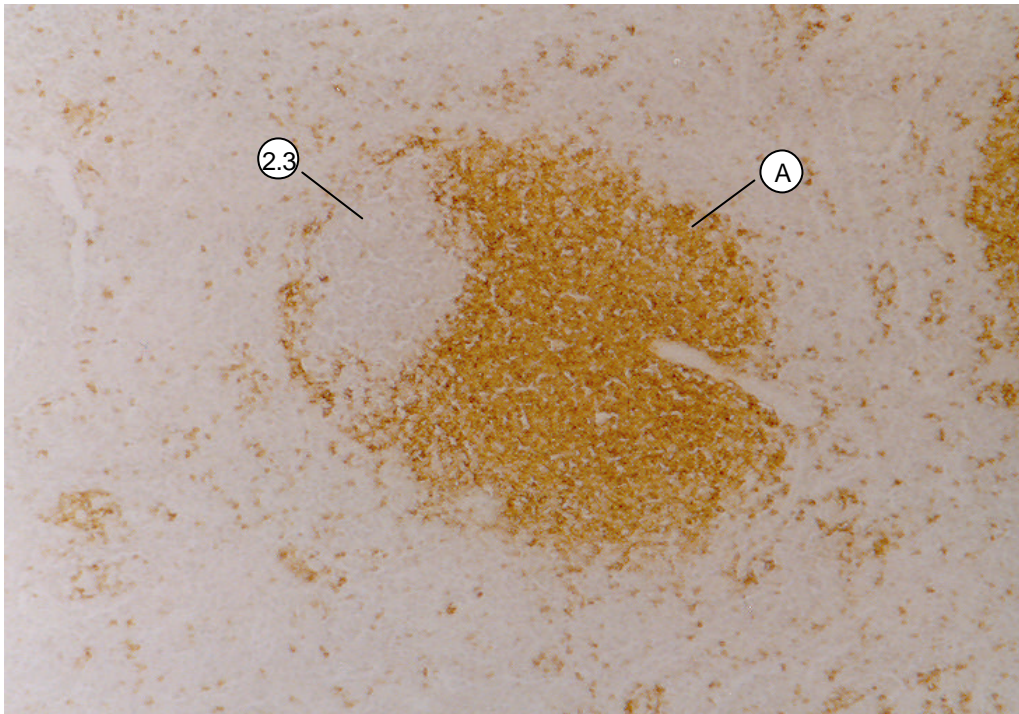


Abb.15: B-Zellfärbung der Schnittebene 4 (Endvergrößerung x 80): Man erkennt einen Schnitt durch den Anfangsbereich des Follikels III (A). B-Lymphozyten aus seiner Marginalzone umschließen ein ungefärbtes Areal, in dem sich T-Zellen (vgl. Abb.16) und die Arteriole 2.3 befinden. Das angeschnittene Gefäß am Follikelrand wurde bei der Rekonstruktion nicht berücksichtigt, weil es erst auf den untersten Schnittebenen auftauchte und sich kein Kontakt zur Arteriole 2.3 zeigte.

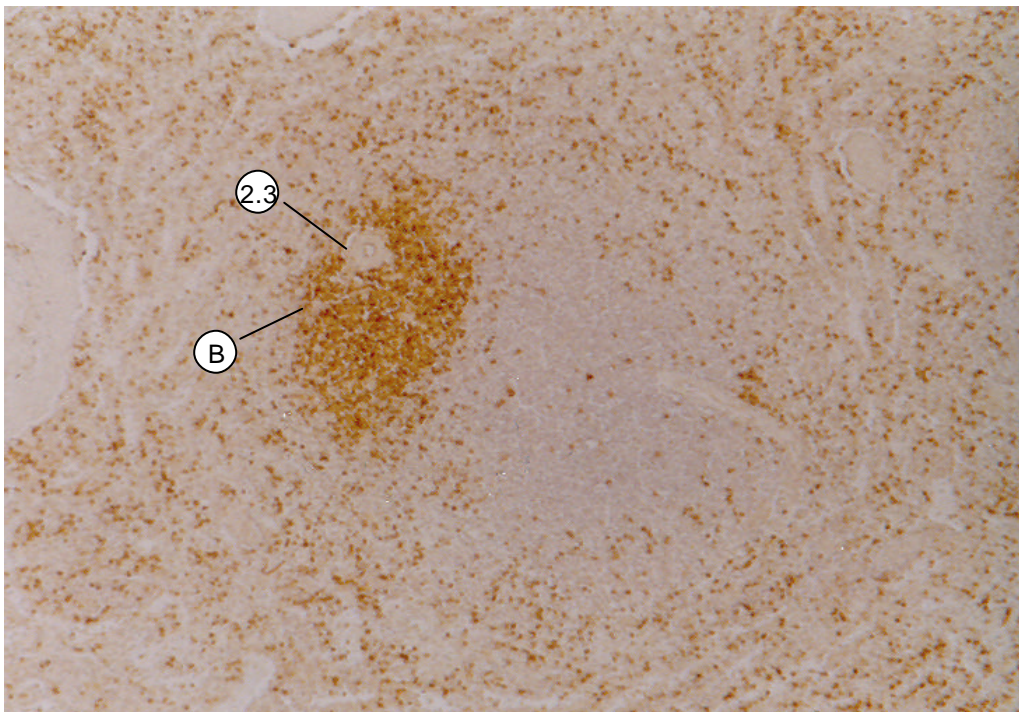


Abb.16: T-Zellfärbung der Schnittebene 4 (Endvergrößerung x 80): Eine solide periarterioläre Scheide aus T-Lymphozyten (B) ist exzentrisch um das Gefäß 2.3 angeordnet.

3.2 Die dreidimensionale Rekonstruktion der T-Zellregion und des Gefäßsystems

Aus den 69 Paraffinschnitten, die mit Antikörpern gegen die Epsilon-Kette des CD3-Komplexes gefärbt wurden, konnten die T-Zellareale der in Abschnitt 3.1 dargestellten Follikel I, II und III rekonstruiert werden. Die T-Zellen bilden eine horizontal verlaufende solide Formation (Abb.17), die dem Follikel I sowie dem Anfang von Follikel II zuzuordnen ist (vgl. Abb. 2 mit Abb.17). An dieses Areal schließt sich links eine durchbrochene kugelschalenförmige Struktur an (Abb.18). Die Kugelschale aus T-Lymphozyten durchdringt die Marginalzone von Follikel I in nahezu seiner gesamten Ausdehnung (vgl. Abb.3 mit Abb.18). Die kompakte T-Zellregion wird durch den Follikel II bis auf vereinzelte schmale Zellstränge verdrängt, die sich in seinen Randzonen befinden (vgl. Abb.3 mit 18). Mit Beginn von Follikel III wird der rechts außen gelegene schlanke T-Zellstrang wieder breiter (vgl. Abb.2 mit Abb.17, Pfeil).

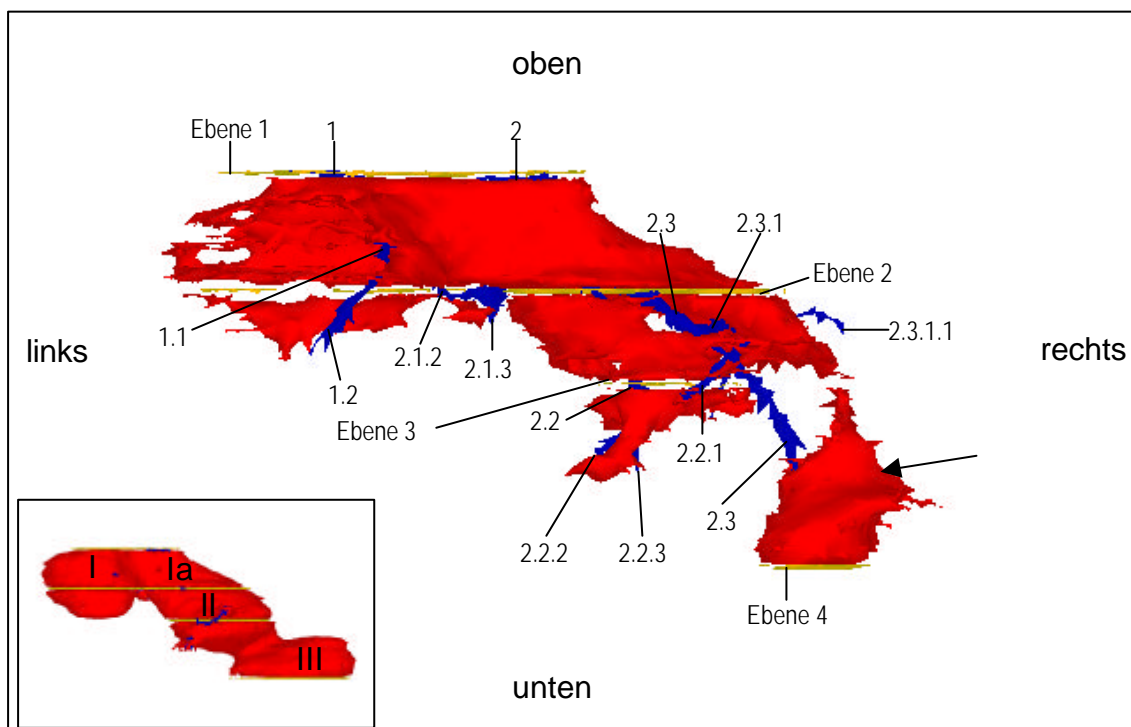


Abb.17: T-Zellregion in der als Frontalansicht festgelegten Darstellung: Die T-Zellen bilden in dem Abschnitt, der dem Follikel I und dem Anfang des Follikels II zuzuordnen ist, eine horizontale Formation. An das solide T-Zellareal schließt sich links eine durchbrochene kugelschalenförmige Struktur an, welche die Marginalzone des Follikels I durchdringt. Die kompakte T-Zellzone wird durch den Follikel II bis auf einzelne schmale Zellstränge weitgehend verdrängt. Mit Beginn des 3. Follikels wird der rechts außen gelegene T-Zellstrang (Pfeil) wieder breiter. Zum Vergleich befindet sich links unten im Bild eine verkleinerte Darstellung der korrespondierenden Follikel.

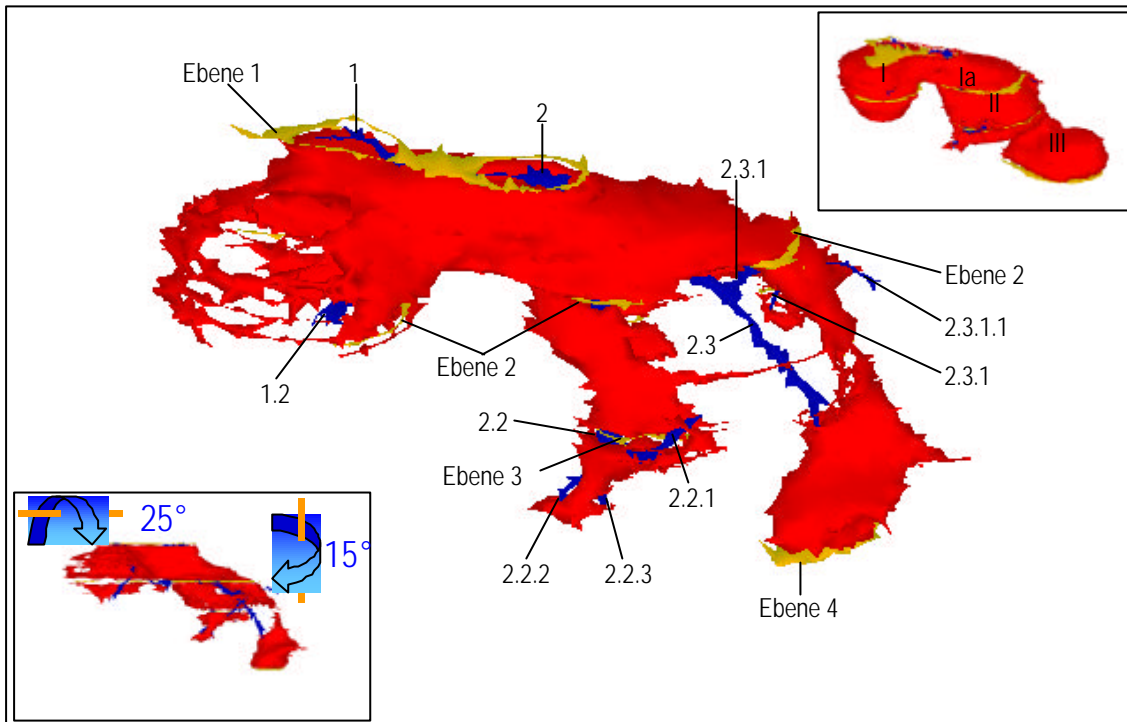


Abb.18: T-Zellareal aus der Frontalansicht um 15° nach rechts gedreht und um 25° nach vorne gekippt: Dadurch ist die kugelschalenförmige Struktur zu erkennen, die sich links an den horizontalen T-Zellbereich anschließt. Dieser löst sich nach unten in zwei schmale Zellstränge auf. In diesem Bereich befindet sich der Follikel II (vgl. mit Abb.3). Der rechts außen verlaufende T-Zellbereich entwickelt sich mit Beginn des Follikels III wieder zu einem kompaktem Zellareal (vgl. mit Abb.3). Zur Orientierung befindet sich in der rechten oberen Bildecke eine verkleinerte Darstellung der Lymphfollikel

Abb.7 zeigt die immunhistologische T-Zellfärbung der Schnittebene 1. Man erkennt einen schmalen, kompakten Verband aus T-Lymphozyten, der die beiden Blutgefäße 1 und 2 von allen Seiten umschließt. Wie bereits im Abschnitt 3.1 erläutert, findet hier eine Durchmischung von B- und T-Zellen statt. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu einer relativ scharfen Trennung der beiden Zellpopulationen, wie man den Abb.19 und 20 entnehmen kann. Diese beiden Aufnahmen entsprechen einer Schnittebene, die etwa in der Mitte zwischen Ebene 1 und Ebene 2, d.h. also im oberen Bereich von Follikel I, liegt. Die Gefäße 1 und 2 befinden sich innerhalb einer dichten Ansammlung aus T-Zellen (Abb.20). Die räumliche Struktur dieser Formation zeigen die Abb. 17 und 18. Auf der linken Seite sind die T-Zellen im Bereich der Marginalzone des Follikels I zu erkennen. Sie sind in Form eines unvollständig ausgebildeten Rings angeordnet (Abb.20). Dieser Bereich ist Teil der kugelschalenförmigen T-Zellstruktur, die den Follikel I in nahezu seiner gesamten Ausdehnung durchzieht (vgl. Abb.3 mit Abb.18).

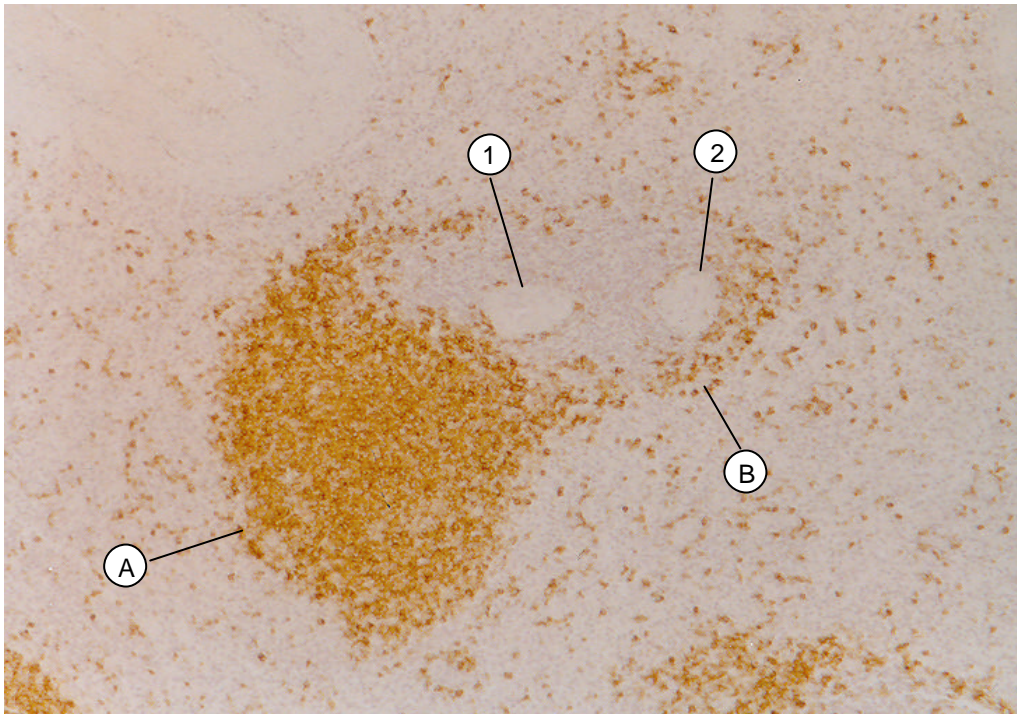


Abb.19: B-Zellfärbung einer Schnittebene, die sich etwa in der Mitte zwischen Ebene 1 und 2 befindet (Endvergrößerung x 80): Aus der Marginalzone von Follikel I (A) ziehen B-Lymphozyten (B) um die T-Zellscheide (vgl.Abb.20) der Arteriolen 1 und 2.

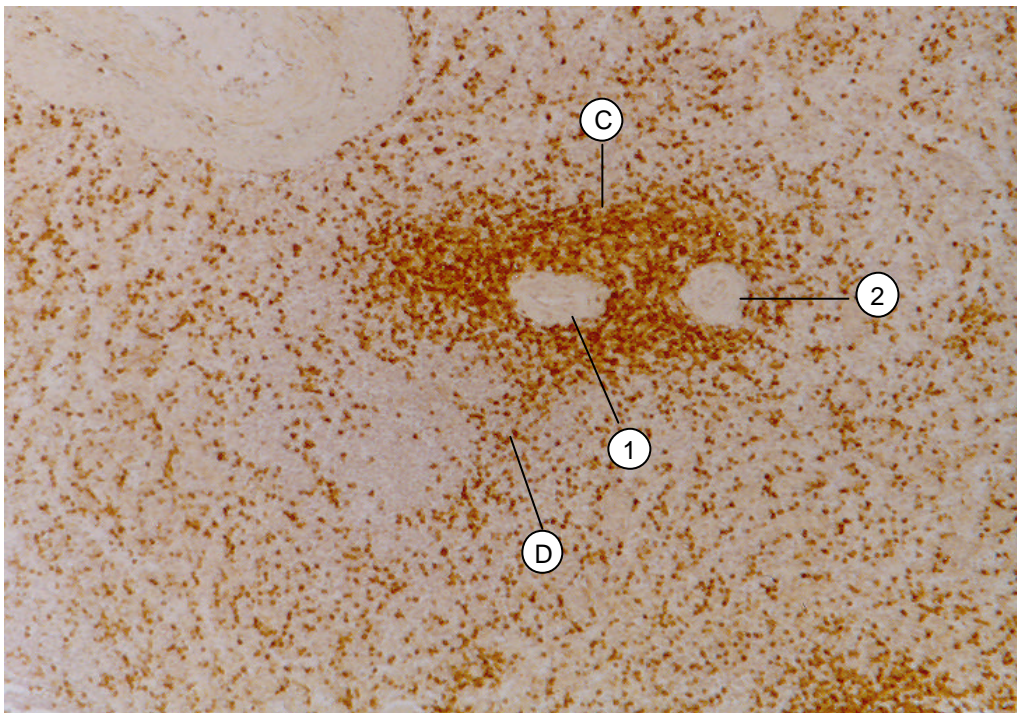


Abb.20: Korrespondierende T-Zellfärbung zur Abb.19 (Endvergrößerung x 80): Eine solide T-Zellscheide (C) umgibt die Arteriolen 1 und 2. Aus diesem Areal ziehen T-Lymphozyten (D) ringförmig in die Marginalzone des Follikels I (vgl. Abb.19)

In der Umgebung der Arteriolen 1 und 2 sowie im Grenzbereich zwischen Follikel I und der T-Zellzone finden sich zwar auch Überlappungsbereiche, insgesamt sind die B- und T-Zellen jedoch eindeutig gegeneinander abgrenzbar. In diesem Abschnitt der weißen Pulpa lässt sich also eine periarteriöläre T-Zellscheide eindeutig von den B-Zellen des Follikels abgrenzen.

Die Arteriole 1 verlässt die solide T-Zellregion in Richtung des ringförmigen T-Zellareals in der Marginalzone von Follikel I (Abb.21 und 22). Die Aufteilung dieses Gefäßes in die Äste 1.1 und 1.2 an der Grenze zwischen B- und T-Zellzone ist auf den dreidimensionalen Rekonstruktionen nicht eindeutig zu erkennen. Dies wird mit Hilfe der immunhistologischen Abb.10 deutlich. Sie zeigt die Verhältnisse im Bereich der Aufzweigung von Arteriole 1. Auf der rechten Seite erkennt man die kompakte T-Zellregion, in der die Arteriole 2 liegt. Auf der linken Seite findet sich die T-Zellansammlung im Bereich der Marginalzone des Follikels I. Aus der Arteriole 1 spaltet sich gerade der Seitenast 1.1 ab. Beide Gefäße liegen an der Grenze zwischen der T- und B-Zellzone. Sie sind auf der rechten Seite von T-Zellen umgeben, während sich auf ihrer linken Seite fast ausschließlich B-Zellen befinden (vgl. Abb.9 mit 10). In diesem Bereich ist demnach keine komplette periarteriöläre T-Zellscheide vorhanden. Die Arteriole 1, die zuvor noch vollständig von T-Zellen umgeben war (Abb.20) hat sich also aus dieser Hülle herausgelöst. Wie bereits im Abschnitt 3.1 erläutert wurde, finden sich in der Umgebung aller Arteriolen auch auf dieser Schnittebene wieder Zonen, in denen sich B- und T-Zellen durchmischen.

Abb.12 zeigt die immunhistologische T-Zellfärbung der Ebene 2. Auf der linken Seite sind die T-Zellen im Bereich der Marginalzone des Follikels I zu erkennen. Zwischen Arteriole 1.2 und den T-Lymphozyten in der Marginalzone befindet sich ein schmales immunhistochemisch ungefärbtes Gebiet. Hierbei handelt es sich um B-Zellen des Follikels I wie ein Vergleich mit Abb.11 zeigt. Das bedeutet, dass die Arteriole 1.2 keine periarteriöläre T-Zellscheide besitzt sondern fast vollständig von B-Zellen umgeben ist (vgl. Abb. 11 und 12). Auf der rechten Seite von Abb.12 erkennt man die T-Zellzone des Follikels II. Sie zeigt an dieser Stelle etwa die Form einer Sichel. Bei dem ungefärbten Areal vor der Arteriole 2.3 handelt es sich um B-Zellen des Follikels II (Abb.11). Auch hier befinden sich im Bereich der Marginalzone einzelne ringförmig angeordnete T-Zellen.

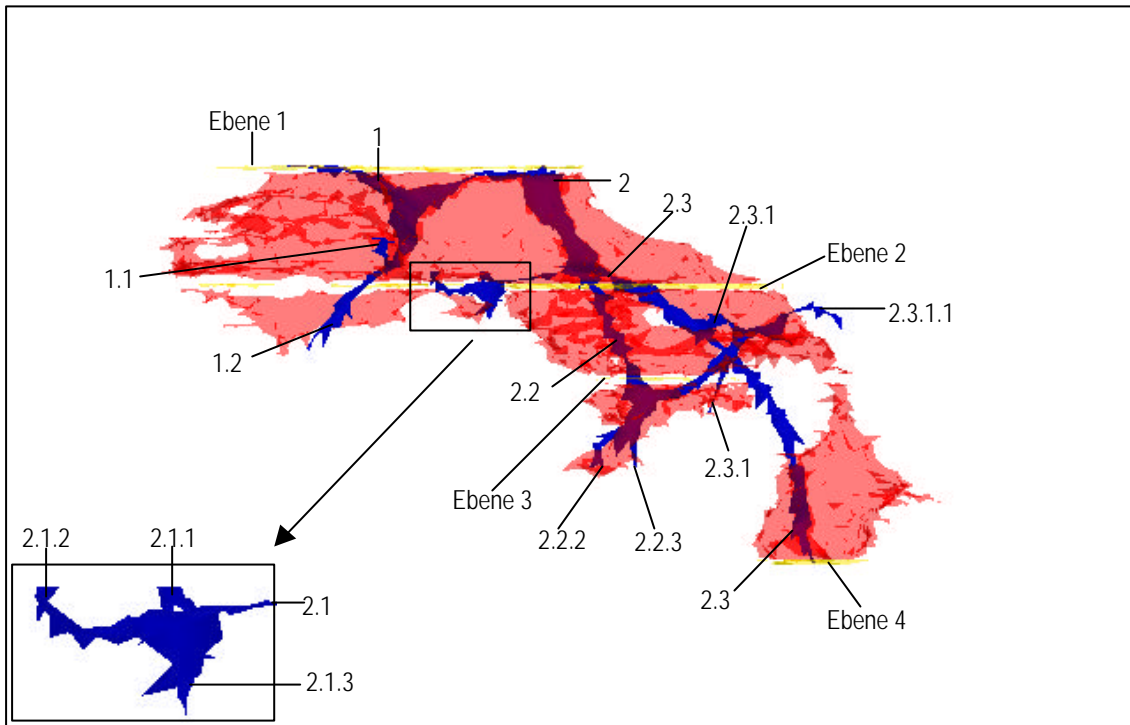


Abb.21: T-Zellregion in der transparenten Frontalansicht: Man erkennt die Arteriolen, die durch die T Zellformation hindurchziehen. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Verhältnisse im Bereich des Gefäßes 2.1. Bei der scheinbaren Aufzweigung der Arteriole 2.1.3 handelt es sich um ein Rechnerartefakt.

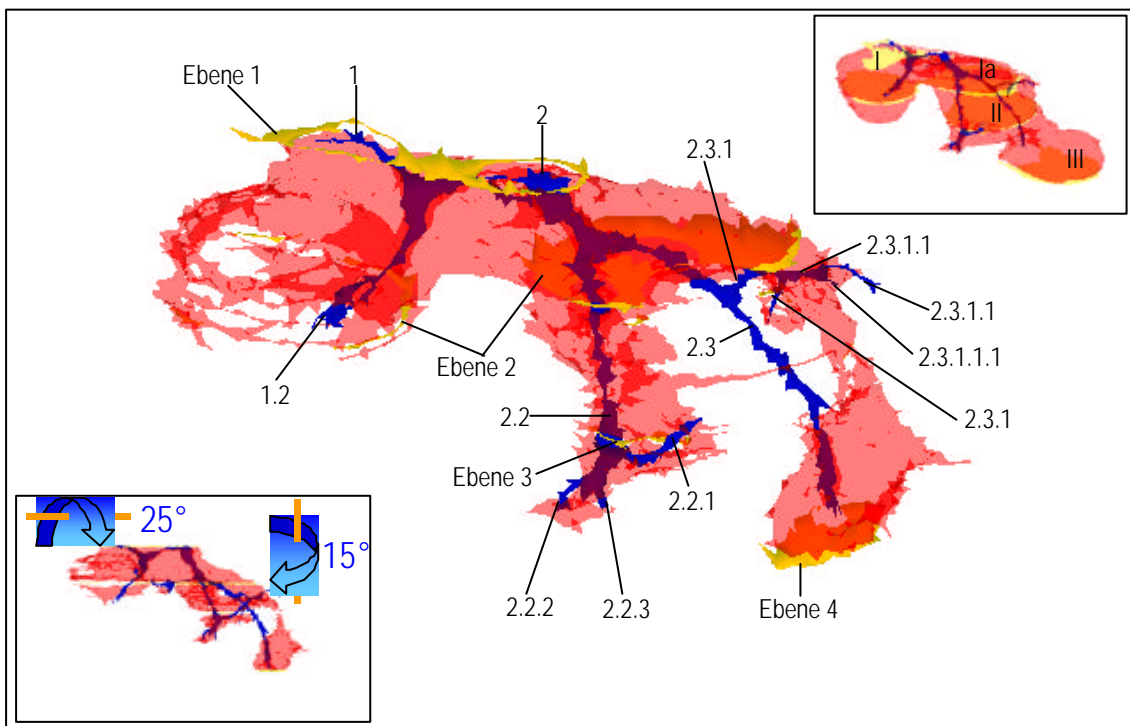


Abb.22: Transparente T-Zellregion aus der Frontalansicht um 15° im Uhrzeigersinn gedreht und um 25° nach vorne gekippt: Mit Ausnahme der Arteriole 2.1 sind die Gefäße weitestgehend überlagerungsfrei dargestellt. Zur Orientierung befindet sich in der rechten oberen Bildecke eine verkleinerte Darstellung der korrespondierenden Follikel.

Wie schon in Abschnitt 3.1 ausgeführt wurde, finden sich in der Umgebung der Arteriolen 2.1, 2.1.1, 2.1.2, 2.2 und 2.3 Überlappungen von B- und T-Zellarealen. Es entstehen also kombinierte B-T-Zellscheiden. Das Gefäß 2.2 befindet sich in seinem weiteren Verlauf durch den Follikel II am Hinterrand einer T-Zellformation. An seiner Rückseite findet sich nur eine schmale Ansammlung von T-Zellen (Abb.23). Die Verhältnisse im Bereich der Arteriole 2.2.1 und der Aufspaltung des Gefäßes 2.2 in seine Endäste 2.2.2 und 2.2.3 stellen sich ähnlich dar. Der überwiegende Anteil der T-Zellen befindet sich am Vorderrand der Gefäße (Abb.23). Man kann hier also nur näherungsweise von einer periarteriolen T-Zellscheide sprechen.

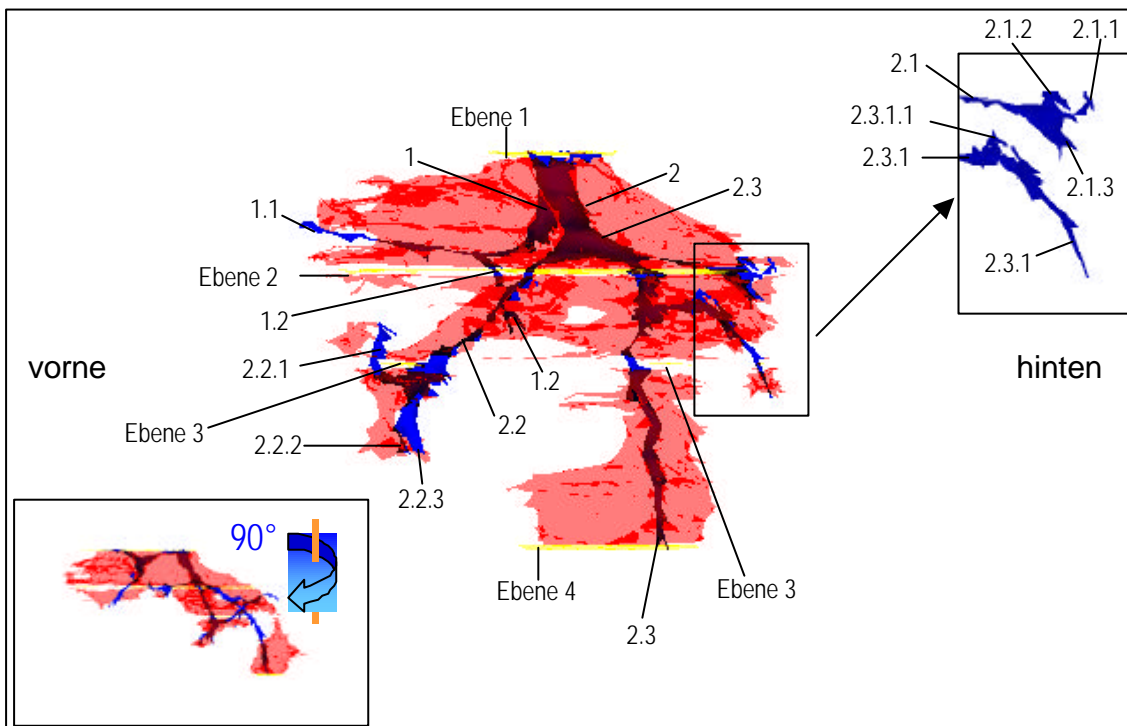


Abb.23: Transparente T-Zellregion um 90° aus der Frontalansicht im Uhrzeigersinn gedreht: Die Detailvergrößerung zeigt die Verhältnisse im Bereich der Aufzweigungen der Arteriolen 2.1 und 2.3.1.

Die Arteriole 2.3 tritt schließlich aus der soliden, horizontal verlaufenden T-Zellregion heraus und ist über eine weite Strecke durch den Follikel II hindurch gar nicht von T-Zellen umgeben (Abb.18). Erst mit Beginn des Follikels III besitzt das Gefäß wieder eine T-Zellscheide (vgl. Abb.5 mit Abb.22 und Abb.8 mit Abb.23).

Vergleicht man die Regionen um die Seitenäste des Gefäßes 2.3.1 in den dreidimensionalen Rekonstruktionen (vgl. Abb.5 mit Abb.22 und Abb.8 mit Abb.23), so stellt man fest, dass auch hier die Arteriolen sowohl von B- als auch

von T-Zellen umgeben sind. Dieser Befund wird bei Betrachtung der entsprechenden immunhistologischen Färbungen deutlicher. Abb.24 zeigt die histologischen Verhältnisse im Bereich der Aufteilungsstellen der Arteriolen 2.2, 2.3, 2.3.1 und 2.3.1.1. Durch Vergleich der jeweiligen B- bzw. T-Zellfärbung der einzelnen Schnittebenen zeigt sich, dass sich die B- und T-Lymphozyten in der Umgebung der Gefäße 2.2, 2.3.1 und 2.3.1.1 durchmischen.

Abb.14 zeigt die der Schnittebene 3 zugrundeliegende T-Zellfärbung. Das T-Zellareal des Follikels II entspricht hier nur noch einem angedeuteten Ring, der in der Marginalzone des Follikels liegt. Vorne befinden sich die Arteriolen 2.2 und 2.2.1. Die T-Zellen bilden in diesem Areal aber keine vollständige Hülle um die Gefäße, sondern liegen hauptsächlich zwischen ihnen. Die B-Zellen des Follikels reichen an die Rückseite der beiden Arteriolen heran und umfassen sie zangenförmig (Abb.13). Auch hier ist also keine echte periarteriöläre T-Zellscheide vorhanden. Das Gefäß 2.3 befindet sich in der Nähe des Keimzentrums. Im hinteren Follikelabschnitt liegt die Arteriole 2.3.1. Auch auf dieser Schnittebene finden sich um die Arteriolen 2.2 und 2.2.1 sowie um das Gefäß 2.3.1 Überschneidungszonen aus B- und T-Zellen. Der Ast 2.3 ist hingegen vollständig in B-Zellen eingebettet (vgl. Abb.13 mit Abb.14).

Abb.16 zeigt die T-Zellfärbung der Schnittebene 4. Die T-Lymphozyten bilden eine dichte Zellformation, in der sich die Arteriole 2.3 in exzentrischer Lage befindet. Dieses Gefäß hat also, nachdem es im Follikel II fast in seinem gesamten Verlauf nur von B-Zellen umgeben war, wieder eine periarteriöläre T-Zellscheide erhalten. Nur in diesem Areal und in der horizontal angeordneten T-Zellregion im oberen Abschnitt der untersuchten weißen Pulpa (Abb.17 und Abb.21) finden sich solide T-Zellscheiden um die Arteriolen. In der Marginalzone des Follikels III befinden sich vereinzelt T-Zellen. Das angeschnittene Gefäß am Follikelrand wurde bei der Rekonstruktion nicht berücksichtigt, weil es erst auf den untersten Schnittebenen auftauchte und sich kein Kontakt zur Arteriole 2.3 zeigte.

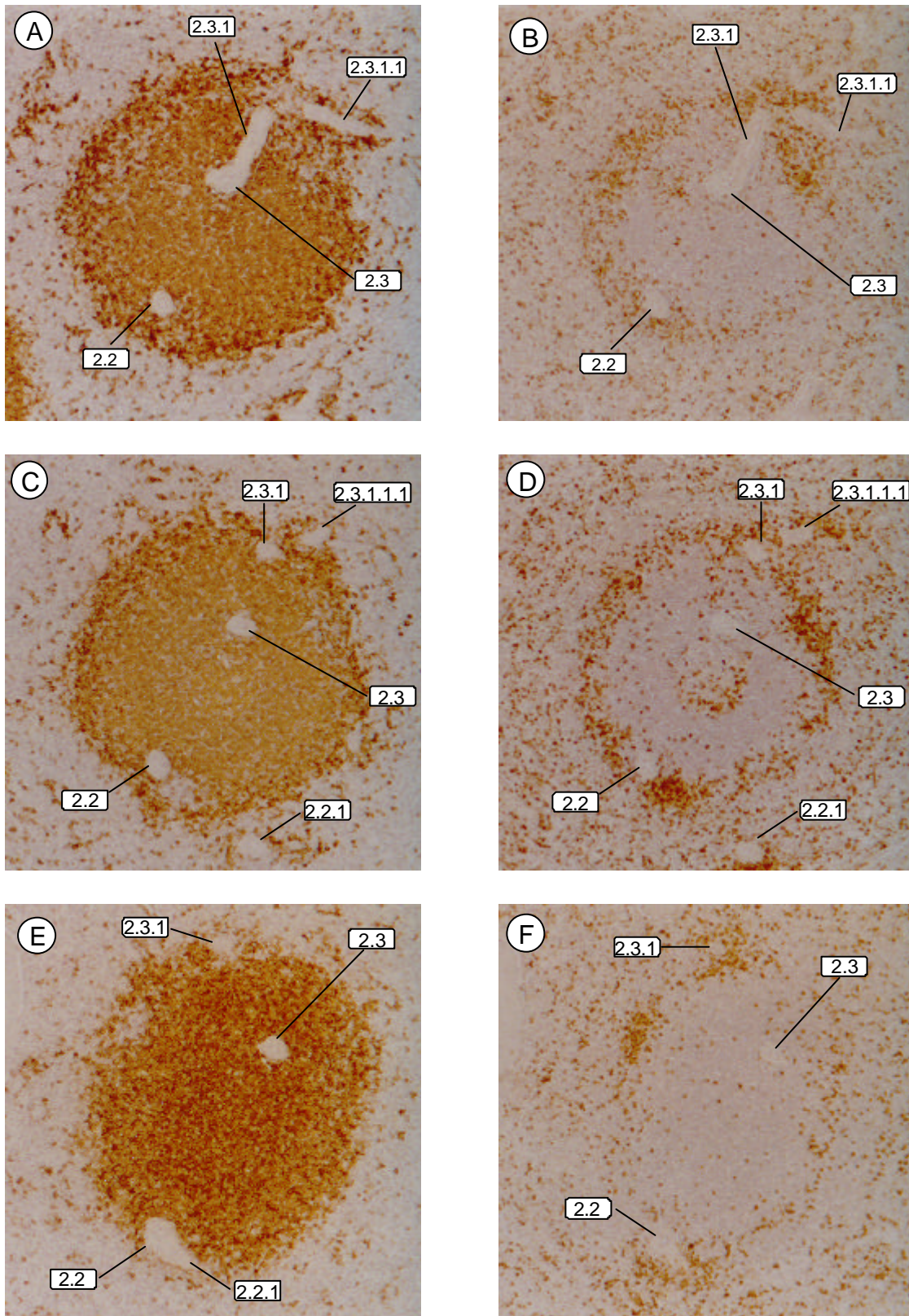


Abb.24: B-Zellfärbungen (A, C, E) und T-Zellfärbungen (B, D, F) von Serienschritten im Aufzweigungsgebiet der Arteriolen 2.2, 2.3, 2.3.1 und 2.3.1.1 (Endvergrößerung x 80): Durch Vergleichen der Abb. A mit B, C mit D sowie E mit F wird deutlich, dass sich periaarteriolar stets Überlappungsbereiche von B- und T-Lymphozyten finden. Eine Ausnahme bildet die Arteriole 2.3. Sie ist fast vollständig in B-Zellen eingebettet.

3.3 Zusammenfassende Darstellung der B- und T-Zellregionen

In der untersuchten Organprobe einer menschlichen Milz wurden die Areale der B- und T-Zellen getrennt rekonstruiert und in den Abschnitten 3.1 und 3.2 beschrieben. Tatsächlich bilden sie aber eine Einheit, nämlich die weiße Pulpa. Im folgenden Abschnitt folgt deshalb eine zusammenfassende Darstellung der beiden Zellareale.

Die B-Zellen formieren sich zu soliden, annähernd kugelförmigen Strukturen, den Follikeln. Im Gegensatz dazu ist die räumliche Anordnung der T-Zellen wesentlich komplizierter. Im Anfangsbereich des Follikels I durchmischen sich B- und T-Lymphozyten (Abb.6 mit Abb.7). In diesem Abschnitt liegt also eine kombinierte B-T-Zellscheide um die Arteriolen vor. Dann entwickelt sich aber eine relativ scharfe Trennung der beiden Zellpopulationen. Die T-Zellen bilden eine solide Scheide um die beiden Gefäße 1 und 2 (Abb.20). Aus dieser Formation ziehen T-Lymphozyten in die Marginalzone des Follikels I, wo sie sich in Gestalt eines unvollständigen Rings anordnen (Abb.10 und 20). In der räumlichen Darstellung wird deutlich, dass diese T-Zellringe eine durchbrochene, kugelschalenförmige Struktur bilden (Abb.18). Gleichzeitig umschließen B-Zellen der Marginalzone des Follikels I die T-Zellregion (Abb.9 und 19). Dieser B-Zellring setzt sich in der Marginalzone von Follikel II fort (Abb.9). Die kompakte T-Zellregion wird durch den sich entwickelnden Follikel verdrängt. Sie reduziert sich auf schmale Bereiche am Rand des Follikels II (vgl. Abb.3 mit Abb.18). Aus einem dieser Areale entwickelt sich mit Beginn des Follikels III wieder eine solide periarterioläre Zellscheide (vgl. Abb.5 mit Abb.22). Die T-Zellregion verändert also ihre Form erheblich. Sie bildet nur im Follikel I und zu Beginn von Follikel III eine solide Struktur. Innerhalb des Follikels II wird sie praktisch vollständig durch B-Zellen verdrängt.

Die Arteriolen sind nicht ausschließlich von T-Lymphozyten in Form einer periarteriolären Scheide umgeben. Nur in Schnitten, die die Mitte des Follikels I treffen (Abb.20) sowie zu Beginn des Follikels III (Abb.16) lassen sich reine T-Zellgefäßscheiden nachweisen. Am Anfang von Follikel I sowie innerhalb des Follikels II sind Gefäße sowohl von B- als auch von T-Lymphozyten umgeben (vgl. Abb.6 mit Abb.7 und Abb.11 mit Abb.12). Einzelne Gefäße sind wiederum nur unvollständig von T-Zellen umgeben, so dass hier der Begriff der

periarteriolären Scheide den Sachverhalt nicht zutreffend beschreibt (Abb.14 und 23). Einzelne Arteriolen können ihre entweder nur aus T- oder aus B- und T-Zellen bestehende Scheide vollständig verlieren und mitten durch einen Follikel hindurchziehen (Abb.14 und 18). In einem Fall findet ein Gefäß mit Beginn des nächsten Follikels wieder Anschluss an eine nur aus T-Zellen bestehende Gefäßscheide (Abb.16 und 22).

Zusammenfassend lassen sich die in der Einleitung gestellten Fragen wie folgt beantworten:

1. Die räumliche Struktur von T-Zellansammlungen innerhalb der weißen Pulpa kann erheblich variieren. Dichte T-Zellansammlungen um die Arteriolen stellen in der durchgeführten Rekonstruktion nicht den Regelfall, sondern lediglich eine mögliche Form dar, in der sich die T-Lymphozyten anordnen können. Die T-Zellen können Arteriolen auch unvollständig umschließen. Darüber hinaus kann eine solide periarterioläre T-Zellformation fast vollständig durch einen Follikel ersetzt werden. Die T-Zellen können sich mit Beginn des nächsten Follikels wieder zu einer kompakten Zellscheide anordnen. Daraus folgt, dass T-Zellansammlungen in der weißen Pulpa der Humanmilz nicht generell als periarterioläre Scheiden zu bezeichnen sind. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erscheint es sinnvoll, den Begriff der PALS durch den allgemeineren Ausdruck „T-Zellareal“ zu ersetzen.

In den rekonstruierten Abschnitten der weißen Pulpa des vorliegenden Präparats kommt es, vor allem in der Umgebung der Arteriolen, zu erheblichen Überlappungen von B- und T-Zellarealen. Auf diese Weise entstehen mitunter Gefäßscheiden, die sich sowohl aus B- als auch aus T-Lymphozyten zusammensetzen. Diese Durchmischungsbereiche sind in schmalen Abschnitten der weißen Pulpa stärker ausgeprägt, als in Bereichen, in denen Zellen zu breiteren Ansammlungen akkumulieren. Hier sind die B- und T-Lymphozyten relativ scharf voneinander getrennt.

2. Die Arteriolen verzweigen sich innerhalb der weißen Pulpa in unterschiedlichem Ausmaß. Gefäßaufteilungen finden sich dabei sowohl innerhalb von B-Zellarealen als auch in Überlappungsbereichen aus beiden Zellpopulationen. Verzweigungen in reinen T-Zellzonen konnten nicht nachgewiesen werden.

3. In der Marginalzone der Lymphfollikel befinden sich T-Zellen. Teilweise sind sie dort nur als einzelne ringförmige Ansammlungen zu erkennen. Sie können sich aber auch zu komplexen kugelschalenförmigen Strukturen anordnen. Die T-Zelldichte in der Marginalzone ist bei einzelnen Follikeln unterschiedlich stark ausgeprägt.
4. B-Zellen aus der Marginalzone der Lymphfollikel bilden Hüllen um solide Anteile von T-Zellregionen und stellen auf diese Weise eine Verbindung zwischen äußeren Bereichen einzelner Follikel her.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden in Paraffinserienschnitten eines Präparates aus einer menschlichen Milz abwechselnd CD3 positive T-Zellen bzw. CD20 positive B-Lymphozyten immunhistologisch dargestellt. Aus diesen Schnitten wurden mit Hilfe geeigneter Computerprogramme dreidimensionale Rekonstruktionen eines Abschnitts der weißen Pulpa mit den zugehörigen Arteriolen erstellt.

Dabei zeigte sich, dass sich T- und B-Zellen in der menschlichen Milz anders anordnen als bei Nagetieren. Die B-Zellen bilden stets annähernd kugelförmige Strukturen, die Follikel, während die T-Zellen sich in variabler Form um die Arteriolen gruppieren. Es gibt neben Bereichen, in denen die T-Lymphozyten dichte Scheiden um die Arteriolen bilden, auch Areale, in denen diese Gefäßscheiden unvollständig ausgebildet sind oder sogar vollständig von B-Lymphozyten verdrängt werden. B- und T-Zellen bilden innerhalb der weißen Pulpa häufig keine streng voneinander getrennten Zonen. Vor allem periarteriolar kommt es mitunter zu ausgeprägten Durchmischungen der beiden Zellpopulationen. Darüber hinaus durchdringen T-Zellen die Marginalzonen von Follikeln und bilden dabei zum Teil komplexe räumliche Strukturen. Andererseits umhüllen B-Zellen T-Zellareale und schaffen auf diese Weise Verbindungen zwischen einzelnen Follikeln. Dies kommt dadurch zustande, dass sich die äußere Marginalzone von der Oberfläche der Follikel auf die Oberfläche der T-Zellzonen fortsetzt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich Arteriolen innerhalb der weißen Pulpa in einem erheblichen Ausmaß aufzweigen.

Dreidimensionale Rekonstruktionen der weißen Pulpa der Humanmilz sucht man in der Primärliteratur vergebens. Es existieren zwar zahlreiche elektronenmikroskopische Analysen der Milz (Fujita 1974; Fujita et al. 1982; Saitoh et al. 1982; Sasou et al. 1986; Satodate et al. 1986; Schmidt et al. 1988). Keine dieser Arbeiten vermittelt jedoch einen umfassenden räumlichen Eindruck der weißen Pulpa. Durch die Rekonstruktion von immunhistologisch gefärbten Serienschnitten ist es in der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen, eine dreidimensionale Darstellung dieses Milzkompartiments beim Menschen zu gewinnen. Dabei konnte bestätigt werden, dass sich die weiße Pulpa aus zwei

Zellkompartimenten zusammensetzt, nämlich aus Ansammlungen von B-Lymphozyten und aus T-Zellzonen (Grogan et al. 1983; Grogan et al. 1984; Hsu et al. 1983; van Krieken et al 1985a; van Krieken und te Velde 1988). In Übereinstimmung mit zahlreichen Autoren (Timens und Poppema 1985; van Krieken et al. 1985a; Timens 1991) wurde gezeigt, dass sich die B-Zellen zu mehr oder weniger runden oder ovalen Gebilden, den sog. Follikeln, anordnen. Schon bei einer ersten Durchmusterung der Serienschnitte zur Auswahl von Arealen, die sich für dreidimensionale Rekonstruktionen eignen, wurde hingegen deutlich, dass die Anordnung der T-Lymphozyten ungleich komplizierter ist als die der B-Zellen. Dieser Eindruck wurde bei der Erstellung der Rekonstruktionen und schließlich bei der Analyse der räumlichen Strukturen bestätigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen sowohl in Einklang mit Steiniger und Barth (2000) als auch mit van Krieken et al. (1985a). Die erstgenannten Autoren weisen darauf hin, dass die Follikel beim Menschen den überwiegenden Teil der weißen Pulpa ausmachen. Die Letztgenannten berichten, dass sich die T-Zellareale weniger voluminös, dafür aber vielgestaltiger als die Follikel darstellen. In Übereinstimmung mit van Krieken und te Velde (1988) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die T-Zellen in der weißen Pulpa der Humanmilz wesentlich weniger regelmäßig angeordnet sind, als sich dies bei Ratten und Mäusen beobachten lässt. Bei letzteren Spezies gruppieren sich die T-Lymphozyten konzentrisch um die sog. Zentralarteriolen (Veerman und van Ewijk 1975). Diese Strukturen werden als periarteriöläre Scheiden (PALS) bezeichnet. Im Gegensatz zu Nagern scheint diese gleichmäßige Form der T-Zellanordnung beim Menschen nicht den Regelfall darzustellen.

Steiniger und Barth (2000) haben in der Humanmilz bereits beobachtet, dass Follikel die periarteriöläre T-Zellzone vollständig verdrängen können. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung, die auf der Analyse von Einzelschnitten beruhte, erstmals durch eine dreidimensionale Darstellung bestätigt werden: Eine solide Gefäßscheide aus T-Zellen kann durch einen sich entwickelnden Follikel bis auf wenige Reste komplett verdrängt werden. In der durchgeführten Rekonstruktion befanden sich diese T-Zellreste in der Marginalzone des Lymphfollikels. Die Zentralarteriole, die zuvor noch von T-Lymphozyten umgeben war, durchlief fast den gesamten Follikel ohne T-Zellscheide und

befand sich dabei auch in unmittelbarer Nähe des Keimzentrums. Dieses Phänomen wird auch von van Krieken et al. (1985a) und von van Krieken und te Velde (1988) beschrieben. Diese Autoren beobachteten Arteriolen, die sogar durch Keimzentren hindurchziehen. Steiniger und Barth (2000) geben drei Möglichkeiten an, die diese Beobachtungen erklären können: 1. Die PALS endet im Follikel. 2. Sie setzt sich fort, nachdem die Arteriole den Follikel durchquert hat oder 3. die intrafollikuläre Arteriole ist ein Seitenast der Zentralarteriole, der nicht mit T-Zellen assoziiert ist. Erst mit Hilfe einer räumlichen Darstellung war es möglich, eine dieser drei Möglichkeiten, nämlich Alternative 2, nachzuweisen. Es zeigte sich, dass ein Follikel die T-Zellzone vollständig von einer Arteriole verdrängte. Aus T-Lymphozyten in der Marginalzone entwickelte sich dann am Ende des Follikels wieder eine Zellscheide um dasselbe Gefäß.

Angesichts dieser Ergebnisse drängt sich die Frage auf, ob der Begriff „periarterioläre Scheide“ für die Humanmilz überhaupt Berechtigung besitzt. Zahlreiche Autoren (Grogan et al. 1993, Hsu et al. 1983; Warnke et al. 1995) beschreiben, dass sich T-Zellen in der weißen Milzpulpa des Menschen zu „periarteriolären Scheiden“ anordnen. Dies ist auch das Bild das übereinstimmend in den gängigen Lehrbüchern (Junqueira et al. 2002; Kipps 2001) vermittelt wird. In klarem Widerspruch dazu vertreten Van Krieken und te Velde (1988) die Ansicht, dass periarterioläre Lymphozytenscheiden beim Menschen nicht existieren. Diese Aussage lässt sich allerdings nicht uneingeschränkt aufrecht erhalten, da in der vorliegenden Arbeit in einigen Bereichen der weißen Pulpa eine PALS eindeutig definiert werden konnte. In den vorliegenden Untersuchungen fanden sich jedoch auch unvollständig ausgebildete Gefäßscheiden sowie Arteriolen ohne T-Zellummantelung. Deshalb ist van Krieken et al. (1985a) sowie van Krieken und te Velde (1986 und 1988) sowie van Krieken (1998) zuzustimmen, wenn sie den Begriff der PALS beim Menschen konsequent vermeiden und stattdessen die allgemeinere Formulierung „T-Zellareale“ verwenden. Dieser Terminus beschreibt die immunhistologischen Verhältnisse in der menschlichen Milz zutreffender als die pauschale Gleichsetzung der T-Zellzonen mit periarteriolären Scheiden.

Außer der besonderen Anordnung der T-Zellen lassen sich in der weißen Pulpa der menschlichen Milz noch weitere Besonderheiten beobachten. So fiel bei der

Betrachtung der dreidimensionalen Rekonstruktionen auf, dass die Arteriolen an einigen Stellen scheinbar sowohl von B- als auch von T-Zellen umgeben waren. Durch Vergleich der Anordnung von B- und T-Lymphozyten in den alternierend gefärbten Serienschnitten wurde dieser Verdacht erhärtet. Dabei war es interessanterweise so, dass die Durchmischung der beiden Zellarten in unmittelbarer Nachbarschaft der Arteriolen am ausgeprägtesten war, so dass teilweise der Eindruck von kombinierten Gefäßscheiden entstand. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Durchmischungen in schmalen Abschnitten der weißen Pulpa intensiver waren, als an Stellen, an denen die periarteriolären Lymphozyten breitere Schichten bildeten. Hier fand sich eine weitgehende Trennung von B- und T-Zellzonen. Tanaka et al. (1984) weisen in der weißen Pulpa von Humanmilzen ebenfalls erhebliche Durchmischungszonen von B- und T-Zellen nach. Auch Grogan et al. (1983), berichten über Überlappungen von B- und T-Zellzonen innerhalb dieses Kompartiments. Allerdings scheint das Ausmaß der Durchmischung in dem der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Präparat intensiver zu sein als in den von Grogan et al. und Tanaka et al. untersuchten Milzen. Dies weist darauf hin, dass die perivaskuläre Durchmischung von B- und T-Lymphozyten wahrscheinlich interindividuellen Schwankungen unterworfen ist.

Die beobachtete Vermischung von B- und T-Zellbereichen könnte sich möglicherweise auch anders erklären lassen. Bei bestimmten T-Zellneoplasien sind T-Lymphozyten nachzuweisen, die das B-Zellantigen CD20 exprimieren (Warzynski et al. 1994; Quintanilla-Martinez et al. 1994). Auch im peripheren Blut gesunder Menschen findet sich eine kleine, schwach CD20-positive T-Zellsubpopulation (Hultin et al. 1993; Quintanilla et al. 1994; Storie et al. 1995). Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass es sich bei den Arealen, die in der vorliegenden Arbeit als Überlappungsbereiche von T- und B-Lymphozyten interpretiert wurden, auch um Gebiete handeln könnte, in denen sich CD20-positive T-Zellen befinden. Die beschriebenen Bereiche scheinbarer Zelldurchmischungen besitzen jedoch ein erhebliches Ausmaß. Um dieses Phänomen auf doppeltgefärbte Lymphozyten zurückzuführen, müsste von einer sehr hohen Anzahl solcher Zellen ausgegangen werden. Diese Annahme ist jedoch eher unwahrscheinlich, da in den oben zitierten Arbeiten über Tumorzellen und Zellen aus dem peripheren Blut übereinstimmend nur kleine

Mengen doppeltpositiver Lymphozyten beobachtet wurden. Deshalb erscheint es naheliegender, dass das im vorliegenden Milzpräparat beobachtete Phänomen durch Vermischung von B- und T-Zellen zustande kommt. In Übereinstimmung mit Grogan et al. (1983) lässt sich dies als Ausdruck der komplexen Interaktion beider Zellarten innerhalb der weißen Pulpa interpretieren.

Nicht nur die Morphologie der zellulären Strukturen der Humanmilz sondern auch die Architektur ihres arteriellen Gefäßbaums wirft immer noch einige Fragen auf. So war bislang z.B. unklar, ob sich Arteriolen, wie dies bei Nagern bekannt ist, auch beim Menschen innerhalb der weißen Pulpa verzweigen. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Sachverhalt nun eindeutig nachgewiesen werden. Sowohl in reinen B-Zellarealen als auch in den oben beschriebenen Durchmischungsbereichen von B- und T-Lymphozyten fanden sich ausgedehnte Gefäßverzweigungen. Innerhalb von reinen T-Zellzonen wurden interessanterweise keine Aufteilungen nachgewiesen. Diese Resultate stehen in klarem Gegensatz zu den Befunden von Kashimura und Fujita (1987). Diese Autoren berichten, dass „Zentralarterien“ die weiße Pulpa durchqueren, ohne Seitenäste abzugeben. Ebenso ließ sich keine Übereinstimmung mit Schmidt et al. (1988) herstellen. Diese Autoren haben in der Mehrzahl der von ihnen untersuchten Präparate beobachtet, dass „Zentralarterien“ dicht am Rand der weißen Pulpa entlangliefen. Hier gaben sie zahlreiche Äste ab, die in die Marginalzone zogen. Im Gegensatz dazu lagen die Arteriolen in den vorliegenden Rekonstruktionen nicht am Rand der weißen Pulpa sondern zogen mitten hindurch und verzweigten sich hier ausgiebig. Bei den meisten Säugetieren findet innerhalb der weißen Pulpa eine ausgeprägte Aufzweigung der arteriellen Blutgefäße statt (Snook 1950; Satodate et al. 1986). Diese Beobachtung entspricht im Wesentlichen dem Bild, das die vorliegenden Rekonstruktionen von humanen Lymphfollikeln zeigen. Die von Snook (1975) beim Menschen beschriebenen „Pinzelarterien“, die aus der roten Pulpa in die Follikel eindringen und sich dort intensiv verzweigen, konnten in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Von Steiniger und Barth (2000) wurde bereits der Verdacht geäußert, dass Follikel in der Humanmilz mit mehr als einer Arteriole assoziiert sein können. Mit Hilfe der vorliegenden dreidimensionalen Darstellungen konnte diese Vermutung

nun eindeutig nachgewiesen werden. Den letztgenannten Autoren ist auch zuzustimmen, wenn sie bemerken, dass es problematisch erscheint, die Bezeichnung „Zentralarteriole“ beim Menschen anzuwenden. Dieser Begriff legt nahe, dass sich die Arteriole zentral innerhalb einer T-Zellscheide befindet. Da dieser Sachverhalt aber beim Menschen, wie beschrieben, eher die Ausnahme als den Regelfall darstellt sollte der Ausdruck „Zentralarteriole“ bei der Beschreibung der menschlichen Milz vermieden werden.

Eine weitere Eigentümlichkeit der Architektur der weißen Pulpa hat in bisherigen Arbeiten über die Humanmilz so gut wie keine Beachtung gefunden. Es handelt sich dabei um ringförmige Ansammlungen von T-Zellen in der Marginalzone der Lymphfollikel. Diese sind in den vorliegenden Rekonstruktionen erstmals in einer dreidimensionalen Darstellung zu sehen. T-Zellakkumulationen im Bereich der Marginalzone wurden bereits von Hsu et al. (1983) sowie von Timens und Poppema (1985) beschrieben. Die Resultate der vorliegenden Arbeit stehen in Einklang mit den Befunden von Steiniger und Barth (2000), die berichten, dass sich die Anzahl der T-Lymphozyten in der Marginalzone zwischen einzelnen Follikeln erheblich unterscheiden kann. In den vorliegenden dreidimensionalen Rekonstruktionen zeigte sich in einem Follikel eine sehr prominente T-Zellansammlung, die einer durchbrochenen Kugelschale ähnelte, welche die Marginalzone des Follikels in nahezu ihrer gesamten Ausdehnung durchdrang. In einem anderen Lymphfollikel fand sich dagegen eine weniger komplex ausgebildete Formation, die nur aus einzelnen T-Zellringen bestand. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den CD3-positiven Zellen in der Marginalzone tatsächlich um T-Lymphozyten handelt, da andere Proben desselben Organs mit zusätzlichen Antikörpern gegen T-Zellantigene, wie z.B. CD4, gefärbt wurden. Auch mit diesen Antikörpern ergab sich stets die gleiche typische Zellanordnung (Steiniger, mündliche Mitteilung). Bei den überwiegend CD3- und CD4-positiven T-Lymphozyten in der Marginalzone könnte es sich um rezirkulierende Zellen handeln, die sich auf ihrem Weg von der perifollikulären Zone in die PALS (besser: T-Zellareal) befinden und dabei spezialisierte Fibroblasten als Leitstruktur verwenden (Steiniger et al. 2001).

Die beschriebenen T-Zellstrukturen könnten darüber hinaus als eine Art Indikator dienen, mit dessen Hilfe sich der immunologische Aktivierungsgrad eines

Lymphfollikels bestimmen ließe. Eine hohe Konzentrationen von T-Lymphozyten in der Marginalzone eines Follikels würde demnach eine hohe immunologische Aktivität bedeuten und umgekehrt.

Doch nicht nur die T-Zellzonen sondern auch die B-Zellareale der humanen weißen Pulpa weisen eine Eigentümlichkeit auf, die in den immunhistologischen Studien über die menschliche Milz mit wenigen Ausnahmen (Steiniger et al. 1997; Steiniger und Barth 2000 und Steiniger et al. 2001), stets vernachlässigt wurde. Es handelt sich dabei um B-Zellen aus der äußeren Marginalzone, die bandförmig um T-Zellareale herumziehen. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Follikel über B-Lymphozyten, die in Form von Hüllen um dichte T-Zellareale angeordnet sind, miteinander in Verbindung stehen. Steiniger et al. (2001) vermuten, dass es sich bei diesen B-Zellen aufgrund ihrer starken IgD-Expression um rezirkulierende Zellen handelt, denen eine spezielle Fibroblastenpopulation als Leitstruktur dient. Diese B-Lymphozyten entsprächen damit denjenigen, die bei Nagern in der äußeren PALS vorkommen (Steiniger et al. 2001). In Verbindung mit den dreidimensionalen Rekonstruktionen liegt die Vermutung nahe, dass B-Zellen zwischen einzelnen Follikeln hin- und herwandern. Sie könnten größere Distanzen innerhalb der Milz zurücklegen und einer Interaktion zwischen Lymphfollikeln dienen. Steiniger und Barth (2000) weisen darauf hin, dass B-Zellbänder um T-Zellareale nicht in allen von ihnen untersuchten Präparaten nachweisbar waren. In Analogie zu der Hypothese, die im Zusammenhang mit den T-Zellformationen in den Marginalzonen aufgestellt wurde, lässt sich annehmen, dass die Ausprägung der B-Zellhüllen in einem direkten Zusammenhang mit der immunologischen Aktivität der jeweiligen Milz steht.

In der vorliegenden Arbeit wurden dreidimensionale Rekonstruktionen aus einer großen Anzahl von Serienschnitten erstellt. Diese Methode ist mit einer Fülle von Schwierigkeiten verbunden. So werden Paraffinschnitte beim Schneidevorgang durch das Mikrotom gestaucht und dehnen sich auf dem Objektträger nach dem Entparaffinieren in einer unkontrollierbaren Weise wieder aus. Dies führt zwangsläufig zu Verzerrungen, die eine dreidimensionale Rekonstruktion erheblich erschweren. Die Einbettung der Präparate in härteres Material wie z.B. Glycol-Methacrylat könnte dieser Problematik zwar entgegenwirken, würde aber

neue Schwierigkeiten hervorrufen: Methacrylat kann, im Gegensatz zu Paraffin, nicht aus einem Schnitt entfernt werden. Es ist deshalb unsicher, ob Antigennachweise, die auf Paraffinschnitten gelingen, auch bei Kunststoffen anwendbar sind. Deshalb erschien es sicherer zu sein, auf die gut etablierte Technik der konventionellen Paraffineinbettung zurückzugreifen.

Die nächste Schwierigkeit bestand darin, das Milzpräparat mit einer Markierung zu versehen, anhand derer die digitalisierten Aufnahmen der Serienschritte aufeinander ausgerichtet werden konnten. Es erschien nicht sinnvoll, Marker in das eingebettete Milzpräparat selbst einzubringen (z.B. dünne Kunststoffstäbe), weil dies den Schneidevorgang erheblich beeinträchtigt hätte. Schließlich wurde ein rechter Winkel in den Paraffinblock hineingefräst und zwar so, dass das eingebettete Präparat mit erfasst wurde (Abb.1). Mit Hilfe dieses Winkels ließen sich die digitalisierten Aufnahmen an einer Ecke des Computermonitors ausrichten. Diese Lösung stellte aber einen Kompromiss dar, da die Kanten des Winkels natürlich auch den oben beschriebenen Stauchungs- und Ausdehnungsvorgängen unterworfen waren und entsprechend verzogen wurden. Es war deshalb nicht möglich, alle Bilder der Serienschritte in identischer Weise an die Ecke des Monitors anzupassen. Ein weiterer Nachteil des gewählten Winkels war, dass er den Bereich begrenzte, der für eine Rekonstruktion zur Verfügung stand. Um dieses Areal möglichst groß zu halten, musste für die Aufnahmen mit der digitalen Kamera eine relativ kleine Vergrößerung gewählt werden. Dieser Umstand führte jedoch zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung, da die gewählte Vergrößerung ausreichte, um die wesentlichen Strukturen mit hinreichender Genauigkeit zu identifizieren.

Die Verzerrung der Präparate einschließlich der angebrachten Markierung ist im Wesentlichen für die Qualitätsbeeinträchtigung der erstellten Rekonstruktionen verantwortlich zu machen. Störend wirkt sich dies bei den Blutgefäßen aus. Ihre Oberfläche erscheint nicht glatt sondern gezackt, was die Verständlichkeit der Darstellung sowie die Detaillierbarkeit teilweise beeinträchtigt. Bei flächenmäßig größeren Strukturen, wie den T- und B-Zellarealen macht sich dieses Problem weniger stark bemerkbar.

Das Computerprogramm, das für die Durchführung der Rekonstruktionen verwendet wurde, ist in erster Linie für die Erstellung von dreidimensionalen

Bildern aus computer- bzw. kernspintomographisch erzeugten Aufnahmen ausgelegt. Bei diesen Techniken treten die Verzerrungen, die das Arbeiten mit Paraffinschnitten erschweren, nicht auf. Deshalb verfügt das Programm auch nicht über ausreichende Hilfsmittel, mit denen sich störende Artefakte beseitigen lassen. Trotzdem war das verwendete Programm in der Lage, aus den histologischen Präparaten dreidimensionale Rekonstruktionen zu erstellen, aus denen sich zahlreiche Ergebnisse ableiten ließen. Vor allem bot es die Möglichkeit, Objekte selektiv transparent darzustellen. Dies war eine entscheidende Voraussetzung für die Beantwortung zentraler Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.

Da die mit Computerhilfe erzeugten Rekonstruktionen in einigen Aspekten unbefriedigend waren, wurden sie in enger Zusammenarbeit mit einem Graphiker überarbeitet. Dieser fertigte Zeichnungen der B- und T-Zellzonen nach dem Vorbild der Rechnermodelle an (Abb.25 und 26). Die teilweise unregelmäßige Gefäßoberfläche wurde geglättet. Außerdem konnte die plastische Wirkung der B- und T-Zellareale verbessert werden.

Der mikroskopische Aufbau der Humanmilz unterliegt erheblichen interindividuellen Schwankungen (van Krieken et al, 1983; van Krieken und te Velde 1988; Steiniger und Barth 2000). Die Histologie des Präparats, das in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde, kann als charakteristisch angesehen werden, da es aus einer repräsentativen Serie von 80 Milzen gesunder Individuen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren stammt (Steiniger, mündliche Mitteilung).

Die vorliegenden Resultate zeigen, dass die weiße Pulpa in der menschlichen Milz eine weitaus kompliziertere Architektur aufweist als bisher angenommen wurde. Die in den meisten Studien sowie in den gängigen Histologielehrbüchern vorgenommene Gleichsetzung von T-Zellansammlungen mit periarteriolen Scheiden ist nicht zutreffend. Es erscheint vielmehr angebracht, den Terminus PALS durch die allgemeinere Formulierung „T-Zellareal“ zu ersetzen. Außerdem ist der Begriff der „Zentralarteriole“ beim Menschen irreführend und sollte vermieden werden. In der weißen Pulpa der Humanmilz findet, wie bei Nagern beschrieben, eine ausgedehnte Verzweigung von arteriellen Blutgefäßen statt. Dies hat zur Folge, dass Follikel in der menschlichen Milz mit mehr als einer Arteriole vergesellschaftet sein können.

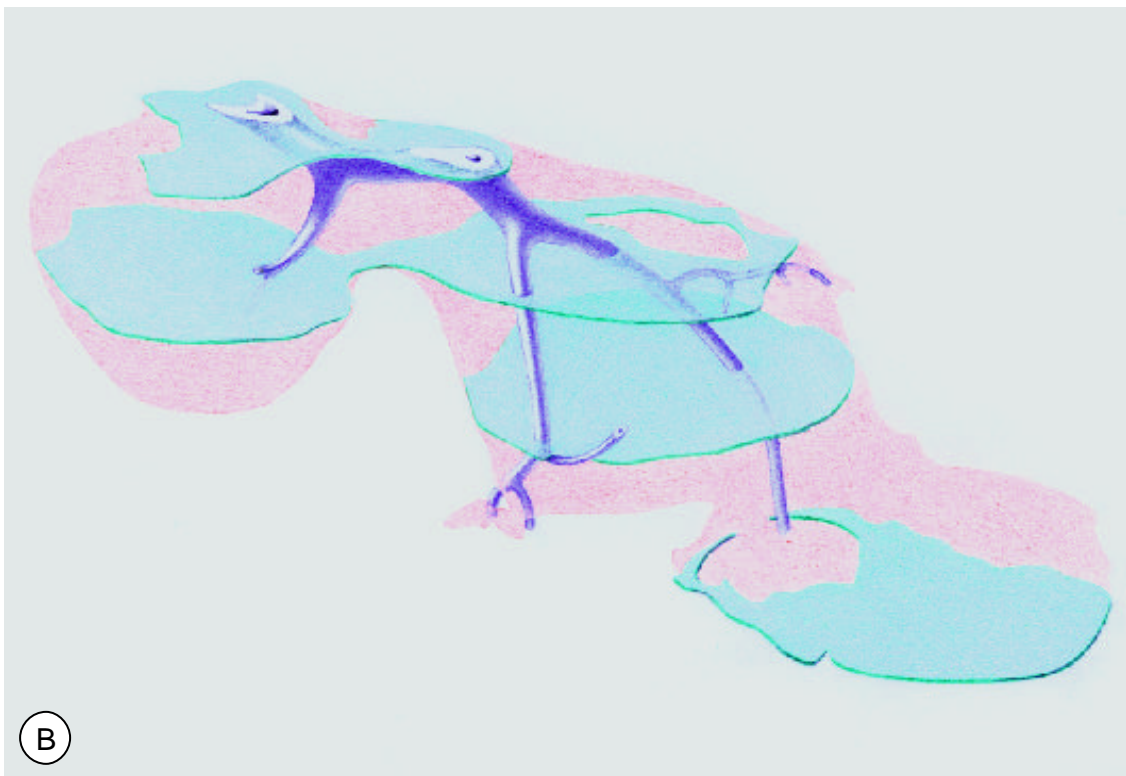


Abb.25: Die graphisch überarbeiteten dreidimensionalen Rekonstruktionen der Lymphfollikel in der nicht transparenten (A) und in der transparenten Darstellung (B). Die entsprechenden mit Computerunterstützung angefertigten Modelle zeigen die Abb.3 bzw. 5 im Abschnitt 3.1. Durch die zeichnerische Nachbearbeitung konnte vor allem die Oberfläche der Blutgefäße geglättet und somit die Detaillierbarkeit verbessert werden.

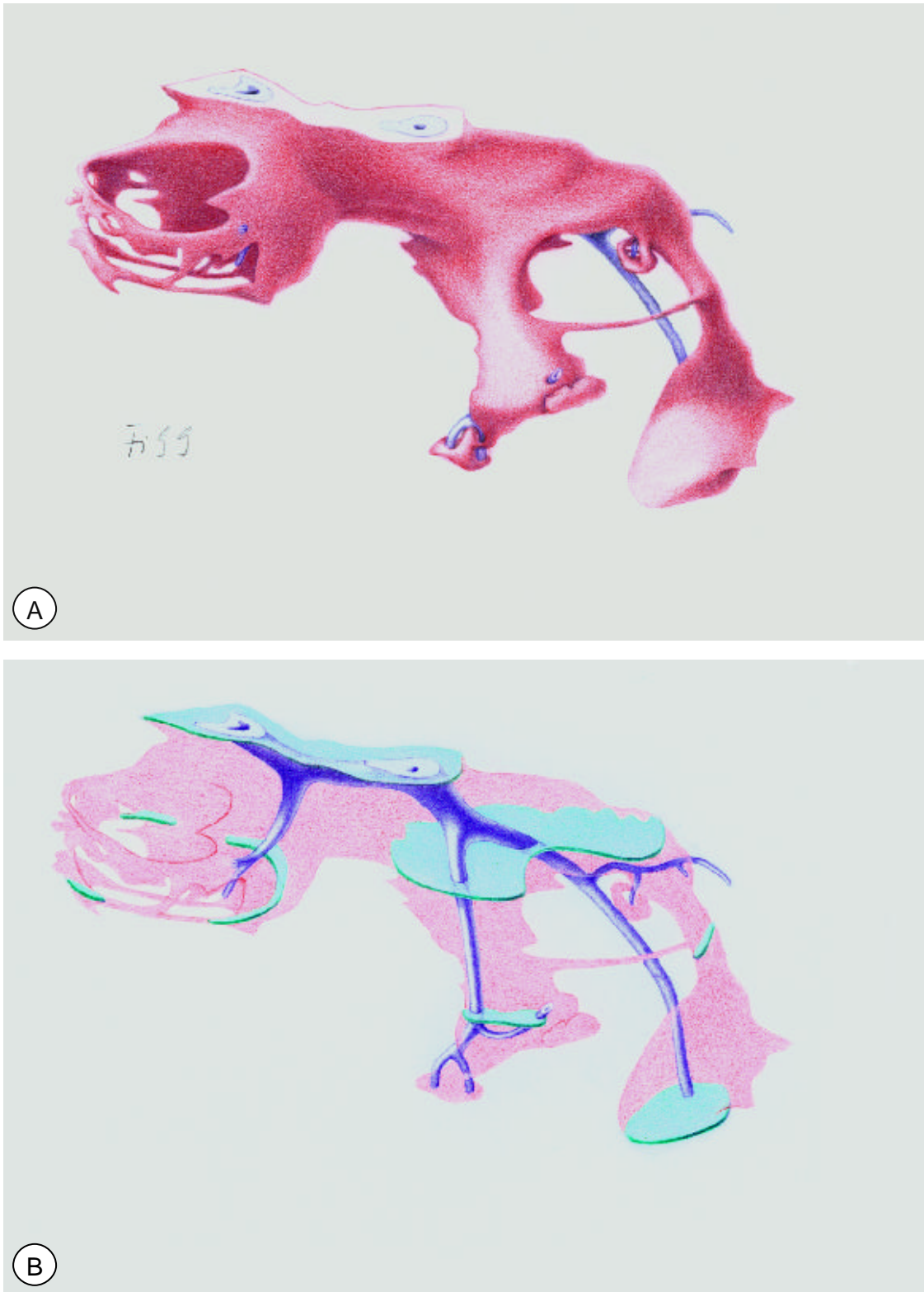


Abb.26: Die mit Hilfe eines Graphikers überarbeiteten räumlichen Modelle der T-Zellareale in der nicht transparenten Darstellung (A) sowie transparent gestaltet, um den Verlauf der Arteriolen sichtbar zu machen (B). Die korrespondierenden Rekonstruktionen, die mit entsprechenden Bildverarbeitungsprogrammen erstellt wurden, zeigen die Abb.18 und 22 in Abschnitt 3.2.

Die Milz ist entscheidend an der primären Antikörperantwort gegen Bakterien mit polysaccharidhaltigen Kapseln beteiligt (Hosea 1983; Kraal 1992; Breukels et al. 2001). Es wird angenommen, dass der Marginalzone bei dieser sog. T-Zell-unabhängigen Immunantwort besondere Bedeutung zukommt (Timens et al. 1989; Timens 1991; Peset Llopis et al. 1996). Auch bei der sog. T-Zell-abhängigen Immunreaktion gegen Proteinantigene, die sich bei Mäusen in der äußeren PALS abspielt (Steiniger und Barth 2000), nimmt die Milz eine wichtige Funktion ein.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Verteilung von B- und T-Zellen in der weißen Pulpa der menschlichen Milz wesentlich von den Verhältnissen bei Nagern unterscheidet. Besonders auffallend war u.a. die komplexe Anordnung der T-Lymphozyten in der Marginalzone. Es drängt sich deshalb die Frage auf, ob dieses Kompartiment beim Menschen nicht nur bei der T-Zell-unabhängigen Antikörperreaktion, sondern auch bei der Interaktion von B- und T-Lymphozyten im Rahmen der T-Zell-abhängigen Immunantwort eine zentrale Rolle spielt. Die Darstellung von Chemokinen, Chemokinrezeptoren und Adhärenzmolekülen könnte hier weiterführen und dazu beitragen, die immunologische Funktion der menschlichen Milz besser zu verstehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Milz ist entscheidend an der Antikörperantwort gegen bestimmte Sepsiserreger beteiligt. Trotz der Bedeutung dieses Organs sind zahlreiche Details seiner mikroskopischen Struktur beim Menschen immer noch ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden CD3 positive T-Lymphozyten bzw. CD20 positive B-Lymphozyten in Paraffinserienschnitten eines Präparates aus einer Humanmilz dargestellt. Aus diesen Schnitten wurde mit Hilfe geeigneter Computerprogramme ein Abschnitt der weißen Pulpa dreidimensional rekonstruiert.

Es zeigte sich, dass die weiße Pulpa beim Menschen überwiegend aus B-Lymphozyten besteht, die sich stets zu kugelförmigen Follikeln anordnen. Demgegenüber stellte sich die räumliche Struktur der T-Zellareale wesentlich komplizierter dar. Eine konzentrische Anordnung der T-Lymphozyten um die Arteriolen im Sinne „periarteriolarer Scheiden“ (PALS) wurde lediglich an wenigen Stellen nachgewiesen. Die T-Zellen bildeten häufig nur unvollständig ausgebildete Gefäßscheiden. In einem der rekonstruierten Follikel ließ sich beobachten, dass die T-Zellscheide vollständig von B-Lymphozyten verdrängt wurde.

Die Arteriolen verzweigten sich innerhalb der weißen Pulpa in einem erheblichen Ausmaß. Dies hatte zur Folge, dass Lymphfollikel mit mehr als einem arteriellen Blutgefäß vergesellschaftet waren. In einem Fall zog eine Arteriole, ohne dass sie von T-Zellen umgeben war, mitten durch einen Follikel hindurch und befand sich dabei auch in unmittelbarer Nähe seines Keimzentrums.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Histologie der Humanmilz sowohl in der Mehrzahl der bisherigen Studien als auch in den einschlägigen Lehrbüchern in einigen Aspekten unzutreffend dargestellt wird. Das Hauptproblem besteht dabei in der unkritischen Übertragung von Befunden aus Milzen von Nagetieren auf die Verhältnisse beim Menschen. Dies zeigt sich u.a. darin, dass die T-Zellzonen in der weißen Pulpa der Humanmilz generell als „periarteriolarer Scheiden“ bezeichnet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen jedoch deutlich, dass diese pauschale Gleichsetzung falsch ist. Der Terminus „PALS“ sollte bei der Beschreibung der menschlichen Milz durch die

allgemeinere Bezeichnung „T-Zellareal“ ersetzt werden. Außerdem ist der Ausdruck „Zentralarteriole“, der z.B. bei Ratten Berechtigung besitzt, beim Menschen irreführend und deshalb zu vermeiden.

B- und T-Zellareale waren innerhalb der weißen Pulpa insbesondere im Bereich der Marginalzone komplex verzahnt. Diese Anordnung ist nur beim Menschen zu beobachten. Sie führt zu der Frage, ob die Marginalzone in der menschlichen Milz ein Kompartiment für die initiale Interaktion von B- und T-Lymphozyten repräsentiert. Zum besseren Verständnis der Interaktion immunkompetenter Zellen in der menschlichen Milz könnte die Analyse der Expression von Adhärenzmolekülen und chemotaktischen Mediatoren in den B- und T-Zellregionen beitragen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Breukels, M.A., Zandvoort, A., van Den Dobbelsteen, G.P., van Den Muijsenberg, A., Lodewijk, M.E., Beurret, M., Klok, P.A., Timens, W., Rijkers G.T. (2001): Pneumococcal conjugate vaccines overcome splenic dependency of antibody response to pneumococcal polysaccharides. *Infect. Immun.* 69: 7583-7587.

Chen, L.T., Weiss, L. (1972): Electron microscopy of the red pulp of human spleen. *Am. J. Anat.* 134: 425-458.

Chen, L.T., Weiss, L. (1973): The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. *Blood* 41: 529-537.

Fujita, T. (1974): A scanning electron microscope study of the human spleen. *Arch. Histol. Jap.* 37: 187-216.

Fujita, T., Kashimura, M., Adachi, K., (1982): Scanning electron microscopy (SEM) studies of the spleen- normal and pathological. *Scanning Electron Microscopy I*: 435-444.

Gray, D., Mac Lennan, I.C.M., Bazin, H., Khan, M. (1982): Migrant $\mu^+\delta^+$ and static $\mu^+\delta^-$ B lymphocyte subsets. *Eur. J. Immunol.* 12: 564-569.

Grogan, T.M., Jolley, C.S., Rangel, C.S. (1983): Immunoarchitecture of the human spleen. *Lymphology* 16: 72-82.

Grogan, T.M., Rangel, C.S., Richter, L.C., Wirt, D.P., Villar, H.V. (1984): Further delineation of the immunoarchitecture of the human spleen. *Lymphology* 17: 61-68.

Groom A.C., Schmidt, E.E., Mac Donald, I.C. (1991): Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. *Scanning Microscopy* 5: 159-173.

Hosea, S.W. (1983): Role of the spleen in pneumococcal infection. *Lymphology* 16: 115-120.

Hsu, S.M., Cossmann, J., Jaffe, E.S. (1983): Lymphocyte subsets in normal human lymphoid tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* 80: 21-30.

- Hultin, L.E., Hausner, M.A., Hultin, P.M., Giorgi, J.V. (1993): CD20 (pan- B-cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry*: 14: 196-204.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., Gratzl, M. (Hrsg.) (2002): *Histologie* (5. Auflage). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 240-245.
- Kashimura M., Fujita T. (1987): A scanning electron microscopy study of human spleen: Relationship between the microcirculation and functions. *Scanning Microscopy* 1: 841-851.
- Kipps, T.J. (2001): The lymphoid tissues, in Williams W.J., Beutler, E., Barry, S.C., Lichtman, M.A. Kipps, T.J., Seligsohn, U. (eds): *Hematology* (sixth edition). Mc Graw-Hill, New York, pp 59-66.
- Kraal, G. (1992): Cells in the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* 132: 31-74.
- Kroese F.G.M., Timens W., Nieuwenhuis P. (1990): Germinal center reaction and B lymphocytes: Morphology and function. *Curr. Top. Pathol.* 84: 103-148.
- Liu, Y.-J., Oldfield, S., Mac Lennan, I.C.M., (1988): Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zone. *Eur. J. Immunol.* 18: 355-362.
- Mac Donald, I.C., Ragan, D.M., Schmidt, E.E., Groom, A.C. (1987): Kinetics of red blood cell passage through interendothelial slits into venous sinuses in rat spleen, analyzed by in vivo microscopy. *Microvasc. Res.* 33: 118-134.
- Mac Lennan, I.C.M., Liu, Y.-J. (1991): Marginal zone B cells respond both to polysaccharide antigens and protein antigens. *Res. Immunol.* 142: 346-351.
- Mason, D.Y., Comans-Bitter, W.M., Cordell, J.L., Verhoeven, M.A., van Dongen, J.J. (1990): Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am. J. Pathol.* 136: 1215-1222.
- Murakami, T., Fujita, T., Miyoshi, M. (1973): Closed circulation in the rat spleen as evidenced by scanning electron microscopy of vascular casts. *Experientia* 29: 1374-1375.

- Peset Llopis, M.J., Harms, G., Hardonk, M.J., Timens, W. (1996): Human immune response to pneumococcal polysaccharides: Complement-mediated localization preferentially on CD21-positive splenic marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 1015-1024.
- Quintanilla-Martinez, L., Preffer, F., Rubin, D. Ferry, J.A., Harris, N.L. (1994): CD20+ T-cell lymphoma. Neoplastic transformation of a normal Tcell subset. *Am. J. Clin. Pathol.* 102: 483-489.
- Saitoh, K., Kamiyama, R., Hatakeyama, S. (1982): A scanning electron microscopic study of the boundary zone of the human spleen. *Cell Tissue Res.* 222: 655-665.
- Sasou, S., Satodate, R., Katsura, S (1976): The marginal sinus in the perifollicular region of the rat spleen. *Cell Tissue Res.* 172: 195-203.
- Sasou, S., Satodate, R., Masuda, T., Takayama, K. (1986): Scanning electron microscopic features of spleen in the rat and human: a comparative study. *Scanning Microscopy III*: 1063-1069.
- Satodate, R., Tanaka, H., Sasou, S., Sakuma, T., Kaizuka, H. (1986): Scanning electron microscopical studies of the arterial terminals in the red pulp of the rat spleen. *Anat. Rec.* 215: 214-216.
- Schmidt, E.E., Mac Donald, I.C., Groom, A.C. (1988): Microcirculatory pathways in normal human spleen, demonstrated by scanning electron microscopy of corrosion casts. *Am. J. Anat.* 181: 253-266.
- Schmidt, E.E., Mac Donald, I.C., Groom, A.C. (1993): Comparative aspects of splenic microcirculatory pathways in mammals: the region bordering the white pulp. *Scanning Microscopy* 7: 613-628.
- Snook, T. (1950): A comparative study of the vascular arrangements in mammalian spleens. *Am. J. Anat.* 87: 31-77.
- Snook, T. (1975): The origin of the follicular capillaries in the human spleen. *Am. J. Anat* 144: 113-117.
- Spencer, J., Perry, M.E., Dunn-Walters, D.K. (1998): Human marginal zone B cells. *Immunol. Today* 19: 421-426.

- Steiniger, B., Barth, P., Herbst, B., Hartnell, A., Crocker, P.R. (1997): The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: Strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone. *Immunology* 92: 307-316.
- Steiniger, B., Barth, P. (2000): *Microanatomy and function of the spleen. Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* 151, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Steiniger, B., Barth, P., Hellinger, A. (2001): The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: Do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am. J. Pathol.* 159: 501-512.
- Storie I., Wilson, G.A., Granger, V., Barnett, D., Reilly, J.T. (1995): Circulating CD20dim T-lymphocytes increase with age: Evidence for a memory cytotoxic phenotype. *Clin. Lab. Haematol.* 17: 323-328.
- Tanaka, H., Takasaki, S., Sakata, A., Muroya, T., Suzuki, T., Ishikawa, E. (1984): Lymphocyte subsets in the white pulp of human spleen in normal and diseased cases. *Acta Pathol. Jpn.* 34: 251-270.
- Timens, W., Poppema, S. (1985): Lymphocyte compartments in human spleen. An immunohistological study in normal spleens and noninvolved spleens in Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 120: 443-454.
- Timens, W., Boes, A., Poppema, S. (1989): Human marginal zone B cells are not an activated B cell subset: Strong expression of CD21 as a putative mediator for rapid B cell activation. *Eur. J. Immunol.* 19: 2163-2166.
- Timens, W. (1991): The human spleen and the immune system: Not just another lymphoid organ. *Res. Immunol.* 142: 316-320.
- Van Ewijk, W. and Nieuwenhuis, P. (1985): Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. *Experientia* 4: 199-208.
- Van Krieken, J.H.J.M., te Velde, J., Hermans, J., Cornelisse, C.J., Welvaart, C., Ferrari, M. (1983): The amount of white pulp in the spleen; a morphometrical study done in methacrylate-embedded splenectomy specimens. *Histopathology* 7: 767-782.

Van Krieken, J.H.J.M., te Velde, J., Kleiverda, K., Leenheers-Binnendijk, L., van de Velde CJH (1985a): The human spleen; a histological study in splenectomy specimes embedded in methylmethacrylate. *Histopathology* 10: 285-294.

Van Krieken, J.H.J.M., te Velde, J., Hermans, J., Welvaart, C. (1985b) The splenic red pulp; a histomorphological study in splenectomy specimes embedded in methylmethacrylate. *Histopathology* 9: 401-416.

Van Krieken, J.H.J.M., te Velde J. (1986): Immunohistology of the human spleen: An inventory of the localisation of lymphocyte subpopulations. *Histopathology* 10: 285-294.

Van Krieken, J.H.J.M., te Velde, J. (1988): Normal histology of the human spleen. *Am. J. Surg. Pathol.* 12: 777-785.

Van Krieken, J.H.J.M. (1998): Functional histology of the human spleen, in conference report: Pathology of the spleen: Report on the workshop of the VIIIth meeting of the European Association for Haematopathology, Paris 1996. *Histopathology* 32: 172-179.

Veerman, A.J.P., van Ewijk, W. (1975): White pulp compartments in the spleen of rats and mice. A light and electron microscopic study of lymphoid and non-lymphoid celltypes in T- and B- areas. *Cell Tissue Res.* 156: 417-441.

Warnke, R.A., Weiss, L.M., Chan, J.C.K., Cleary, M.L., Dorfman, R.F. (1995): Tumors of the lymph nodes and spleen, in atlas of tumor pathology, third series, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., pp 3-14.

Warzynski, M.J., Graham, D.M., Axtell, R.A., Zakem, M.H., Rotman, R.K. (1994): Low level CD20 expression on T cell malignancies. *Cytometry* 18: 88-92.

7 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Universitätsprofessoren und Dozenten:

Arnold, Aumüller, Barth, Baum, Basler, Bertalanffy, Bien, Bolm, Christiansen, Daut, Effendy, Engel, Feuser, Fischer, Fruhstorfer, Fuhrmann, Gemsa, Geus, Gotzen, Griss, Gröne, Gressner, Grzeschik, Habermehl, Happle, Hasilik, Hesse, Höffken, Kälble, Kern, Kleine, Klenk, Klose, Koch, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lang, Lange, Lennartz, Löffler M., Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nies, Oertel, Radsak, Remschmidt, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schüffel, Schulz, Schulze, Schwarz, Seitz, Seyberth, Slenczka, Steiniger, Stinner, Sturm, Suske, Thomas, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, von Wichert.

8 DANKSAGUNG

Mein erster und besonderer Dank gilt Professor Dr. Birte Steiniger; sie hat diese Arbeit durch die Bereitstellung des Themas ermöglicht. Ihr Wissen, ihr Rat und ihre konstruktive Kritik in langen Diskussionen waren mir eine entscheidende Hilfe.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. habil. Veronika Grau bedanken. Ihre Ruhe und Kompetenz halfen mir sehr, wenn es galt, Schwierigkeiten und Misserfolge zu meistern.

Birgit Herbst leistete hervorragende Arbeit bei der Anfertigung der Serienschnitte. Außerdem verdanke ich ihr die Einführung in zahlreiche Arbeitstechniken der Immunhistologie.

Dank gilt Professor Dr. Peter Barth für die freundliche Bereitstellung des Humanmilzpräparates.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Thomas Hurek vom Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg. Seine Ausdauer und Kreativität waren mir in zahlreichen Nächten, in denen die Probleme der computerunterstützten dreidimensionalen Rekonstruktion bewältigt wurden, eine große Hilfe.

Christian Fiebiger stellte bei der graphischen Darstellung der B- und T-Zellareale seine Fähigkeiten eindrucksvoll unter Beweis.

9 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „die weiße Pulpa der menschlichen Milz: Eine dreidimensionale Rekonstruktion“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Steiniger ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Karlsruhe, den 15.04.2002

Lars Rüttinger